

STRUKTURELLE ANALYSE NEUARTIGER TRYPTOPHAN SYNTHASEN UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG IHRER HOMOLOGEN

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Alexander Ehrmann aus Regensburg

Januar 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 20. Januar 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Oberprieler

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

2. Prüfer: Prof Dr. Michael Thomm

3. Prüfer: Prof. Dr. Jörg Heilmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Januar 2010 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner angefertigt.

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
FORMELVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Bedeutung von Protein-Protein Interaktionen.....	4
1.2 Die Biosynthese von Tryptophan.....	5
1.3 Die Tryptophan Synthase aus <i>Salmonella typhimurium</i> und <i>Escherichia coli</i>	7
1.3.1 Struktur und Funktion.....	7
1.3.2 Katalysemechanismus der TrpA- und TrpB-Untereinheiten.....	10
1.3.3 Allosterische Kommunikation der Untereinheiten während des Reaktionszyklus des $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplexes	12
1.4 Die Evolution der Tryptophan Synthasen: Eine neue Klasse von TrpB Enzymen	15
1.5 Die hyperthermophilen Prokaryoten <i>Thermotoga maritima</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> und <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit	23
2 MATERIAL.....	24
2.1 Bakterien- und Archaeenstämme	24
2.2 Vektoren	26
2.2.1 pET-Vektoren für die Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	26
2.2.2 Vektoren für die Expression von Proteinen in <i>S. solfataricus</i>	27
2.2.3 Der pJET 1.2 Vektor zur Erstellung von Deletionsstämmen in <i>T. kodakaraensis</i>	28
2.3 Oligodesoxyribonukleotide	29
2.3.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer	29
2.3.2 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für <i>trpA</i> Gene.....	30
2.3.3 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für <i>trpB</i> Gene.....	30
2.3.4 Primer zur Herstellung der <i>T. kodakaraensis</i> Deletionsstämmen $\Delta trpB2$, $\Delta trpB1$ und $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$	31
2.4 Längenstandards.....	33
2.5 Enzyme.....	33
2.6 Chemikalien.....	34
2.7 Antikörper	34

2.8 Kits	35
2.9 Verbrauchsmaterialien	35
2.10 Geräte	36
2.11 Nährmedien für <i>E. coli</i>	38
2.12 Nährmedium für <i>S. solfataricus</i>	39
2.13 Nährmedien für <i>T. kodakaraensis</i>	39
2.14 Nährmedium für <i>T. maritima</i>	43
2.15 Puffer und Lösungen	43
2.15.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	43
2.15.2 Arbeiten mit <i>T. kodakaraensis</i> , <i>T. maritima</i> und <i>S. solfataricus</i>	44
2.15.3 Agarosegelelektrophorese	45
2.15.4 Western Blot und Dot Blot Puffer	45
2.15.5 Polyacrylamidgelelektrophorese	45
2.16 Software	46
3 METHODEN	48
3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen	48
3.2 Mikrobiologische Methoden	48
3.2.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen	48
3.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur chemischen Transformation	48
3.2.3 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	49
3.2.4 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur Elektrottransformation	49
3.2.5 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation	50
3.2.6 Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen	50
3.2.7 Anzucht und Lagerung von <i>S. solfataricus</i>	50
3.2.8 Transformation elektrisch kompetenter <i>S. solfataricus</i> Zellen	51
3.2.9 Anzucht und Lagerung von <i>T. kodakaraensis</i>	51
3.2.10 Hitzeschocktransformation bei <i>T. kodakaraensis</i>	52
3.2.11 Erstellung von Wachstumskurven mit <i>T. kodakaraensis</i>	52
3.2.12 Herstellung von organischen Extrakten aus <i>T. kodakaraensis</i>	53
3.2.13 Anzucht von <i>T. maritima</i>	55
3.3 Molekularbiologische Methoden	55
3.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. solfataricus</i> und <i>T. kodakaraensis</i>	55
3.3.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	55
3.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation)	56
3.3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation)	56
3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	56
3.3.4 Agarosegelelektrophorese	57
3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	57
3.3.6 Enzymatische Manipulation von dsDNA	57

3.3.6.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen	57
3.3.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	58
3.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	58
3.3.8 Kolonie-PCR.....	59
3.3.9 PCR-Methoden zur gerichteten Mutagenese	59
3.3.9.1 Megaprimer-PCR (Sarkar & Sommer, 1990)	59
3.3.9.2 <i>Overlap Extension</i> -PCR (Ho et al., 1989)	60
3.3.10 DNA-Sequenzierung.....	60
3.4 Proteinchemische und organisch-chemische Methoden	61
3.4.1 Genexpression und Proteinanreicherung	61
3.4.1.1 Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab	61
3.4.1.2 Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab	62
3.4.1.3 Herstellung von löslichen Proteinrohextrakten aus <i>S. solfataricus</i> und <i>T. maritima</i>	64
3.4.2 Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion	64
3.4.2.1 Hitzeschritt.....	65
3.4.2.2 Metallchelat-Affinitätschromatographie	65
3.4.2.3 Ionenaustauschchromatographie	66
3.4.2.4 Dialyse von Proteinlösungen	67
3.4.2.5 Umpuffern von Proteinlösungen über Gelfiltration	68
3.4.2.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen	68
3.4.2.7 Lagerung von gereinigtem Protein	68
3.4.3 Markieren von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	68
3.4.4 Synthese von Indolpropanolphosphat (IPP)	69
3.5 Analytische Methoden	71
3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie.....	71
3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	72
3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	73
3.5.4 Densitometrische Proteinbestimmung mittels SDS-PAGE.....	74
3.5.5 Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (native PAGE)	74
3.5.6 Western Blot	75
3.5.7 Dot Blot	76
3.5.8 Vorbereitung der N-terminalen Sequenzierung	77
3.5.9 Analytische Gelfiltration	77
3.5.10 Analytische Ultrazentrifugation	78
3.5.10.1 Sedimentationsläufe	78
3.5.10.2 Gleichgewichtsläufe	80
3.5.11 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	82
3.5.12 Massenspektrometrie.....	84
3.5.13 Fluoreszenz-Spektroskopie	84
3.5.13.1 Messung der Ligandenbindung an TrpA	85
3.5.13.2 Messung von Protein-Protein Interaktionen über die intrinsische Fluoreszenz von TrpB.....	86
3.5.13.3 Messung von Protein-Protein Interaktionen über die PLP Fluoreszenz	86

3.5.14 Isothermische Titrationskalorimetrie.....	86
3.5.15 <i>Steady-state</i> Enzymkinetik.....	87
3.5.15.1 Messung der TrpA-Aktivität	87
3.5.15.2 Messung der TrpB-Aktivität	87
3.5.15.3 Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase	87
3.5.16 Genereller kolorimetrischer Nachweis von enzymatischer Desaminaseaktivität	88
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	89
4.1 Transiente Protein-Protein Interaktionen des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>S. solfataricus</i>.....	89
4.1.1 Klonierung, Reinigung und Fluoreszenzmarkierung der benötigten Proteine.....	89
4.1.2 Charakterisierung des in <i>S. solfataricus</i> exprimierten sTrpB2i	100
4.1.3 Allosterische Kommunikation zwischen den aktiven Zentrum von sTrpA und sTrpB2i.....	103
4.1.4 Stabilisierung, Stöchiometrie und Quartärstruktur des Komplexes	107
4.1.5 Röntgenkristallstruktur des Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i	139
4.1.6 Abschließende Diskussion: Der transiente $\alpha\beta\beta$ Komplex aus sTrpB2i und sTrpA	139
4.2 Funktionsuntersuchungen an TrpB2o	146
4.2.1 Überprüfung früherer Hypothesen bezüglich der Funktion von TrpB2o.....	147
4.2.2 Suche nach makromolekularen Interaktionspartnern von TrpB2o	149
4.2.3 Erstellung von Deletionsstämmen in <i>T. kodakaraensis</i>	152
4.2.4 Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten im Vergleich mit wildtypischem <i>T. kodakaraensis</i>	159
4.2.5 Katalytische Parameter der TrpB-Reaktion von TrpB2o	160
4.2.6 Akkumulation potenzieller Substrate und Produkte von TrpB2o in Zellextrakten von <i>T. kodakaraensis</i>	161
4.2.7 Abschließende Diskussion zu den Funktionsuntersuchungen an TrpB2o.....	171
5 LITERATURVERZEICHNIS	177
6 ANHANG	190
6.1 Nomenklatur für <i>trpB</i> Gene	190
6.2 Kalibrierung der Superdex 75 HR 10/300 GL Gelfiltrationssäule	191
6.3 Aktivität von TrpB Enzymen in EPPS Puffer	191
6.4 Synthese von Indolpropanolphosphat.....	194
6.5 DNA Sequenzen der verwendeten Konstrukte für die Herstellung von Deletionsstämmen	195
6.6 Massenspektren der untersuchten Metabolite aus <i>T. kodakaraensis</i>	198
7 DANKSAGUNG.....	203
8 ERKLÄRUNG	205

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionen und Enzyme der Tryptophan Biosynthese.....	6
Abbildung 2: Organisation des <i>trp</i> Operons bei den in dieser Arbeit verwendeten Organismen.	6
Abbildung 3: TrpA- und TrpB-Teilreaktionen und Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase.	8
Abbildung 4: Struktur der Tryptophan Synthase aus <i>S. typhimurium</i>	8
Abbildung 5: Mechanismus der TrpA-Reaktion.	10
Abbildung 6: Struktur des aktiven Zentrums von TrpA aus <i>S. typhimurium</i> mit gebundenem Übergangszustandsanalogon 2-HGP.	11
Abbildung 7: Mechanismus der TrpB-Reaktion.	12
Abbildung 8: Reaktionszyklus der Tryptophan Synthase.	13
Abbildung 9: Strukturelle Elemente der allosterischen Kommunikation bei der Tryptophan Synthase aus <i>S. typhimurium</i>	14
Abbildung 10: Phylogenetischer Baum von TrpB Sequenzen (A) und Operonorganisation der <i>trpA</i> , <i>trpB1</i> und <i>trpB2</i> Gene (B).	16
Abbildung 11: Multiples Sequenzalignment von TrpB Sequenzen.	18
Abbildung 12: Struktureller Vergleich von sTrpB2a und pfTrpB1.	21
Abbildung 13: pMZ1, Zwischenklonierungsvektor für die Expression in <i>S. solfataricus</i>	27
Abbildung 14: pMJ05 Virus-Shuttlevektor für die Proteinexpression in <i>S. solfataricus</i>	28
Abbildung 15: pJET1.2, Vektor für die <i>blunt end</i> Klonierung von PCR Produkten	29
Abbildung 16: Struktur des Cystein-reaktiven Fluorophors Alexa Fluor 488 C ₅ -Maleimid.	69
Abbildung 17: Synthese von Indolpropanolphosphat (IPP),	70
Abbildung 18: Zeitabhängige Änderung des Konzentrationsgradienten im Sedimentationsgleichgewichts-Experiment.....	81
Abbildung 19: Kolorimetrischer Desaminasenachweis nach Hatfield	88
Abbildung 20: SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) zum Nachweis der Reinheit von sTrpB2a (1), tmGAPDH (2), tmTrpA (3), tmtrpA W201F (=tmTrpA ΔW) (4), tmTrpB1 (5) und tmTrpB2 (6).	92
Abbildung 21: Reinigung von sTrpA aus <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIPL.	93
Abbildung 22: SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) zum Nachweis der Reinheit der hergestellten sTrpA Varianten.	94
Abbildung 23: Lage der Austausche S206C bzw. S229C im Modell des sTrpA-sTrpB2i Komplexes (links) und Struktur des verwendete Alexa Fluor 488 C5 Maleimid Farbstoffes (rechts).	95
Abbildung 24: Überprüfung der Markierungseffizienz von sTrpA S206C mit dem Fluorophor Alexa488.	96
Abbildung 25: Probeexpression von sTrpB2i: Vergleich von <i>fed batch</i> (links) mit klassischen <i>batch</i> Kultivierungen (rechts).	97
Abbildung 26: Reinigung von sTrpB2i aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) RIPL.	99
Abbildung 27: Analyse der Komplexbildung zwischenaus <i>S. solfataricus</i> gereinigtem sTrpB2i und rekombinantem sTrpA über analytische Gelfiltration.	102
Abbildung 28: Reaktionsschema der Tryptophan Synthase.	104
Abbildung 29: Effekt von tmTrpA und Liganden auf das Absorptionsspektrum der PLP-Addukte von tmTrpB1.	105
Abbildung 30: Effekt von sTrpA und Liganden auf das Absorptionsspektrum der PLP-Addukte von sTrpB2i.	106

Abbildung 31: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA in Anwesenheit von Serin und GP.	107
Abbildung 32: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA in Anwesenheit von Serin oder GP.	108
Abbildung 33: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA S206C Alexa 488 in Anwesenheit von Serin und GP.	110
Abbildung 34: Sedimentation von sTrpA S206C Alexa488 in Anwesenheit von GP und Serin.	111
Abbildung 35: Sedimentation des Gemisches von sTrpA S206C Alexa488 mit sTrpB2i in Anwesenheit von Serin (A) bzw. Serin plus GP (B)	112
Abbildung 36: Fluoreszenztitration von sTrpA mit GP in Anwesenheit von sTrpB2i und Serin.	113
Abbildung 37: Struktur und Funktion von allosterisch aktiven TrpA-Liganden.	114
Abbildung 38: <i>In situ</i> Bildung der TrpA Übergangszustandsanaloga 2-HGP und NGP.	115
Abbildung 39: Fluoreszenztitration von IPP mit (A) tmTrpA ΔW und (B) sTrpA ΔW bzw. von IGP mit sTrpA ΔW (C).	116
Abbildung 40: Einfluss allosterischer TrpA-Liganden sowie der TrpB-Substrate Indol und Serin auf die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2i.	118
Abbildung 41: <i>dc/dt</i> Ansatz zur Untersuchung des Einflusses einiger allosterischer TrpA-Liganden sowie Serin auf die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2i.	119
Abbildung 42: Tryptophanspezifische Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante und Stöchiometrie des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>T. maritima</i> . .	121
Abbildung 43: PLP-spezifische Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante und Stöchiometrie des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>T. maritima</i>	122
Abbildung 44: PLP-spezifische Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>S. solfataricus</i>	123
Abbildung 45: Isothermische Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Assoziationskonstante und Stöchiometrie des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>S. solfataricus</i>	125
Abbildung 46: Analytische Gelfiltration und densitometrische Kalibrierung zur Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>T. maritima</i>	127
Abbildung 47: Densitometrische Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>T. maritima</i>	128
Abbildung 48: Analytische Gelfiltration und densitometrische Kalibrierung zur Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>S. solfataricus</i>	129
Abbildung 49: Densitometrische Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus <i>S. solfataricus</i>	129
Abbildung 50: Sedimentationsgleichgewichtsanalyse von sTrpB2i, sTrpA S206C Alexa 488 und einer Mischung der beiden Proteine, jeweils in Anwesenheit von GP und Serin.	131
Abbildung 51: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA S206C Alexa 488 bei 65 °C und pH 6,0 in Abwesenheit von Liganden.	134
Abbildung 52: Detektion der Komplexbildung von tmTrpA und tmTrpB1 nach analytischer Gelfiltration über Immunodetektion mit anti-tmTrpB1 Antikörpern.	135
Abbildung 53: Analytische Gelfiltration zum Nachweis des nativen Tryptophan Synthase Komplexes in löslichen Zellextrakten aus <i>T. maritima</i>	136
Abbildung 54: Versuchter Nachweis des nativen Tryptophan Synthase Komplexes in löslichen Zellextrakten aus <i>S. solfataricus</i>	137
Abbildung 55: Nachweis eines Tryptophan Synthase Komplexes in löslichen Zellextrakten aus <i>S. solfataricus</i> in An -und Abwesenheit von zugesetztem, rekombinantem sTrpA.	138

Abbildung 56: Quantifizierung von tmTrpB1 und tmTrpB2o in <i>T. maritima</i> bei verschiedenen Wachstumstemperaturen.	148
Abbildung 57: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der makromolekularen Assoziation von tmTrpB2o in löslichen Zellextrakten aus <i>T. maritima</i>	149
Abbildung 58: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der makromolekularen Assoziation von sTrpB2a in löslichen Zellextrakten aus <i>S. solfataricus</i>	150
Abbildung 59: Native Gelelektrophorese zum Nachweis des Komplexes zwischen tmTrpA und tmTrpB1 <i>in vitro</i>	151
Abbildung 60: Native PAGE zur Untersuchung makromolekularer Assoziation von tmTrpB1 und tmTrpB2o in löslichen Zellextrakten aus <i>T. maritima</i>	152
Abbildung 61: Strategie zur Herstellung von <i>T. kodakaraensis</i> $\Delta trpB2o$ über homologe Rekombination.	154
Abbildung 62: Herstellung des Konstrukts pJet 1.2. $\Delta trpB2o$	154
Abbildung 63 Strategie zur Herstellung von <i>T. kodakaraensis</i> $\Delta trpB1$ über homologe Rekombination.	155
Abbildung 64: Herstellung des Konstrukts pJet 1.2. $\Delta trpB1$	155
Abbildung 65: Organisation des <i>trp</i> Operons in <i>T. kodakaraensis</i> KU216 $\Delta trpB1$	156
Abbildung 66: Strategie zur Herstellung des Komplementationsstamms <i>T. kodakaraensis</i> $\Delta hisD::trpB1$ über homologe Rekombination.	156
Abbildung 67: Herstellung des Konstrukts pJet 1.2. $\Delta hisD::trpB1$	157
Abbildung 68: Verifizierung des Stammes $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$ über PCR Analyse.	158
Abbildung 69: Wachstumsverhalten von <i>T. kodakaraensis</i> KU 216 Wildtyp, $\Delta trpB2$ und $\Delta trpB2$ bei 85 °C.	159
Abbildung 70: Hypothese zur Funktion von TrpB2o auf der Basis der Michaelis-Menten Konstanten für Indol und Serin.	161
Abbildung 71: Experimenteller Ansatz zur Nutzung der charakteristischen Indolfluoreszenz für die Identifizierung des potenziellen TrpB2o-Produktes „Y“.	161
Abbildung 72: Auftrennung verschiedener Indolderivate mit Hilfe der entwickelten HPLC Methode.	162
Abbildung 73: Auf die Zelleinwaage normierte Proteinextrakte aus <i>T. kodakaraensis</i>	163
Abbildung 74: Quantitativer Vergleich und Massenbestimmung fluoreszierender Metabolite in methanolischen Extrakten aus <i>T. kodakaraensis</i> KU216 Wildtyp und $\Delta trpB2o$	164
Abbildung 75: MS-MS Analyse des im $\Delta trpB2o$ Stamm akkumulierenden Metaboliten 5 der Masse 175 Da.	166
Abbildung 76: Quantitativer Vergleich fluoreszierender Metabolite in Ethylacetat-Extrakten aus <i>T. kodakaraensis</i> KU216 Wildtyp und $\Delta trpB2o$ Fermentationsüberständen.	168
Abbildung 77: Quantitativer Vergleich von bei 280 nm absorbierenden Metaboliten in organischen Extrakten aus Fermentationsüberständen von <i>T. kodakaraensis</i> KU216 Wildtyp und $\Delta trpB2o$	169
Abbildung 78: MS-MS Analyse der im Fermentationsüberstand des Wildtyp Stammes akkumulierten Metabolite.	170
Abbildung 79: Kalibrierung der Superdex 75 HR 10/300 GL Gelfiltrationssäule.	191
Abbildung 80: Aus <i>steady-state</i> Enzymkinetiken abgeleitete Serin-Sättigungskurven der Tryptophan Synthase aus <i>S. solfataricus</i> bei 60 °C in EPPS Puffer.	192
Abbildung 81: Verfolgung der Synthese von Indolpropanolphosphat über <i>reversed phase</i> HPLC.	194
Abbildung 82: LC ESI-MS des methanolischen Extrakts von <i>T. kodakaraensis</i> KU216 Wildtyp.	198
Abbildung 83: LC ESI-MS des methanolischen Extrakts von <i>T. kodakaraensis</i> KU216 $\Delta trpB2o$	200

Abbildung 84: LC ESI-MS der organischen Extrakte aus Fermentationsüberständen von <i>T.</i> <i>kodakaraensis</i> KU216 Wildtyp.....	202
--	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten und molare Masse (MW) der verwendeten Proteine und Substrate bzw. Liganden.	72
Tabelle 2: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.	73
Tabelle 3: Zusammensetzung eines Gels für die native PAGE.	74
Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten primären Antikörper im Western Blot.	76
Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten primären Antikörper im DotBlot.	77
Tabelle 6: Vorhandene Konstrukte für die Untersuchung der Komplexbildung von sTrpA und sTrpB2i.	90
Tabelle 7: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter bei 60 °C der serinabhängigen Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase in EPPS Puffer.....	193
Tabelle 8: <i>Steady-state</i> enzymkinetische Parameter bei 60 °C der serinabhängigen TrpB-Teilreaktion der Tryptophan Synthase: Vergleich von 50 mM Kaliumphosphat- und 100 mM EPPS- Puffer.....	193

Formelverzeichnis

Formel 1: Bestimmung der DNA-Konzentration.	56
Formel 2: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280}	71
Formel 3: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$	71
Formel 4: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$	71
Formel 5: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten s	79
Formel 6: Lamm-Gleichung zur Behandlung mehrerer sedimentierender Spezies in einem Sedimentationslauf.....	79
Formel 7: Berechnung von M aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen	81
Formel 8: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz von der zutitrierten Ligandenmenge.....	85
Formel 9: Berechnung des Hill Koeffizienten n_H nach Lane (1982).	133

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß der Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Schreibweise abgekürzt.

A	Absorption; Adenosin
Å	Ångström (10^{-10} m)
$0,1\%A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxosulfid
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
C	Cytosin
c	Konzentration
Cα	zentrales C-2 Kohlenstoffatom von Aminosäuren
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
CV	<i>Column Volume</i> (Säulenvolumen)
Da	Dalton [g/mol]
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N= A, C, G oder T)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) (<i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
F	femto (10^{-12})
G	Guanosin
g	Gramm, Zentrifugalbeschleunigung
<i>his</i>	Gene, die für die Enzyme des Histidinbiosynthesewegs codieren
(His) ₆ -tag	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein (Hexahistidin-tag)
<i>hisB</i>	Gen für die Imidazol Glycerinphosphat Dehydratase HisB
<i>hisD</i>	Gen für die Histidinol Dehydrogenase HisD
<i>hisG</i>	Gen für die ATP Phosphoribosyltransferase HisG
<i>hisH</i>	Gen für die Glutamin Amidotransferase
<i>hisZ</i>	Gen für das Regulatorprotein HisZ, Interaktionspartner von HisG
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie)
Hs	löslicher Überstand des Hitzeschritts
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin; Gleichgewichtskonstante
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
k_{cat}	Wechselzahl

k_{cat}/K_M	katalytischer Effizienzparameter
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton ($1 \cdot 10^3$ g/mol)
K_i	Inhibitionskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KP	Kaliumphosphat Puffer
<i>lacZ</i>	Gen für die β -Galactosidase
LB	Luria-Bertani (-Medium)
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar [mol/l]
mA	Milliampère
MW	Molekulargewicht
mwco	<i>molecular weight cut off</i>
n	nano ($1 \cdot 10^{-9}$)
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal Ende einer Polypeptidkette
OD _x	optische Dichte bei x nm
OE	<i>overlap extension</i>
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids (<i>origin of replication</i>)
P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextraktes)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
<i>pyrE</i>	Gen, welches für die Orotidin-5'-monophosphat Pyrophosphorylase codiert (Uracil-Biosynthese)
<i>pyrF</i>	Gen, welches für die Orotidin-5'-monophosphat Decarboxylase codiert (Uracil-Biosynthese)
R	Allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
<i>rmsd</i>	<i>root mean square deviation</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
SCOP	<i>Structural Classification of Proteins</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
sTrpA	TrpA aus <i>S. solfataricus</i>
sTrpB2i	TrpB2i aus <i>S. solfataricus</i>
sTrpB2a	TrpB2a aus <i>S. solfataricus</i>
sTrpC	TrpC aus <i>S. solfataricus</i>
T	Temperatur; Thymidin
<i>T. kodakaraensis</i>	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
T _A	<i>annealing</i> -Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
T_M	Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tkTrpA	TrpA aus <i>T. kodakaraensis</i>
tkTrpB1	TrpB1 aus <i>T. kodakaraensis</i>
tkTrpB2o	TrpB2o aus <i>T. kodakaraensis</i>
tmTrpA	TrpA aus <i>T. maritima</i>
tmTrpB	TrpB aus <i>T. maritima</i>
tmTrpF	TrpF aus <i>T. maritima</i>
tmTrpC	TrpC aus <i>T. maritima</i>
<i>trp</i>	Gene, die für Enzyme des Tryptophanbiosyntheseweges kodieren
<i>trpF</i>	Gen für die Phosphoribosylanthranilat Isomerase
U	<i>Unit</i> , 1U entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1µmol Substrat pro Minute umsetzt
UAS	<i>upstream activation sequence; upstream activating site of transcription</i>
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen
Δ	Differenz
ΔG	freie Energie
Δtrp	Stamm mit Defizienz für die Aktivität des Enzyms des Tryptophanbiosyntheseweges
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
λ	Wellenlänge
μ	Mikro ($1 \cdot 10^{-6}$)

Zusammenfassung

Multienzymkomplexe dienen zur Koordination der Katalyse aufeinander folgender Reaktionen in Stoffwechselwegen. Einer der am besten untersuchten Multienzymkomplexe ist die Tryptophan Synthase, die seit Jahrzehnten als Modellsystem für die Untersuchung der strukturellen Grundlagen und funktionellen Konsequenzen von Protein-Protein Interaktionen dient. Die prototypische Tryptophan Synthase, wie sie zum Beispiel in den mesophilen Bakterien *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* gefunden wird, ist ein stabiler heterotetramerer $\alpha\beta\alpha$ Komplex, der die Bildung von Tryptophan aus Indol-3-glycerinphosphat (IGP) und Serin katalysiert. Dabei spaltet die α -Untereinheit TrpA ihr Substrat IGP zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) und Indol, welches durch einen hydrophoben Kanal zum aktiven Zentrum der β -Untereinheit TrpB1 Untereinheit wandert und dort mit Serin zu Tryptophan kondensiert. Die isolierten TrpA und TrpB1 Proteine bilden stabile, aber nur schwach aktive α -Monomere und $\beta\beta$ -Homodimere. Im $\alpha\beta\alpha$ Komplex kommt es innerhalb der funktionellen $\alpha\beta$ -Einheiten zu einer ausgeprägten allosterischen Kommunikation, die zur Koordination und starken wechselseitigen Stimulierung der beiden Teilreaktionen führt.

Im Rahmen von Genomsequenzierungsprojekten wurde in zahlreichen Archaeen, Bakterien und Pflanzen zusätzlich oder alternativ zum konventionellen *trpB1* Gen ein *trpB2* Gen identifiziert. Die *trpB1* Gene finden sich in der Regel im *trp* Operon und liegen dort benachbart zum *trpA* Gen vor. Die meisten *trpB2* Gene finden sich außerhalb (*trpB2o* und *trpB2a*), einige auch innerhalb (*trpB2i*) des *trp* Operons. Während die Ähnlichkeit auf Aminosäureebene innerhalb der TrpB1 und TrpB2 Familien etwa 60% beträgt, liegt sie zwischen den Familien bei ungefähr 30 %.

In früheren Arbeiten wurden die tmTrpA und tmTrpB2o Proteine aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*, sowie die sTrpA, sTrpB2a und sTrpB2i Proteine aus dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Bei der anschließenden Charakterisierung konnte ein Komplex aus tmTrpA und tmTrpB2o bzw. sTrpA und sTrpB2a weder direkt nachgewiesen noch indirekt über die wechselseitige Stimulation der katalytischen Aktivitäten der Untereinheiten nachgewiesen werden. Dagegen wurde eine 300-fache Erhöhung der katalytischen Effizienz von sTrpA durch sTrpB2i beobachtet, ohne dass jedoch ein direkter Nachweis eines Komplexes aus diesen beiden Proteinen gelang. In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei Projekten die Eigenschaften von TrpB2 Proteinen genauer untersucht.

Das erste Projekt behandelte das ungewöhnliche Komplexbildungsverhalten der Operon-kodierten Proteine sTrpB2i und sTrpA, deren Interaktion bisher lediglich indirekt über

Aktivitätstitrationen nachgewiesen worden war. Mit Hilfe von Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie sowie analytischer Gelfiltration konnte nun gezeigt werden, dass sich durch den TrpA-Liganden Glycerin-3-phosphat (GP) und das TrpB-Substrat Serin die Bildung eines stabilen Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i induzieren lässt, wobei beide Liganden für die Komplexbildung nötig sind. Fluoreszenztitrationen, isothermale Titrationskalorimetrie und analytische Ultrazentrifugation ergaben eine thermodynamische Dissoziationskonstante für die Bildung des Komplexes in Anwesenheit beider Liganden im Bereich von 300-1800 nM. Damit ist die Affinität zwischen sTrpA und sTrpB2i um ungefähr zwei Größenordnungen niedriger als die zwischen den TrpA und TrpB1 Untereinheiten in prototypischen Tryptophan Synthasen. Die Affinität des ligandeninduzierten Komplexes wird durch GP mindestens um den Faktor 1000 erhöht. Solche stark ligandenabhängigen Protein-Protein Interaktionen wurden für Stoffwechsellenzyme bisher sehr selten gefunden. Die Titrationsexperimente sowie densitometrisch ausgewertete analytische Gelfiltrationsexperimente ergaben zudem eine Komplex-Stöchiometrie von 0.5 sTrpA zu 1 sTrpB2i Untereinheiten. Die daraus abgeleitete ungewöhnliche $\alpha\beta\beta$ Quartärstruktur, die durch umfangreiche analytische Ultrazentrifugationsexperimente bestätigt wurde, deutet auf eine stark ausgeprägte negative Kooperativität für die Bindung der zweiten α -Untereinheit an das $\alpha\beta\beta$ Protomer hin. Aus der Untersuchung des Assoziationszustands in Anwesenheit von GP und verschiedenen anderen Substrat-, Übergangszustands- und Produktanaloga von TrpA lässt sich schließen, dass der Tryptophan Synthase Komplex aus sTrpA und sTrpB2i während des gesamten Katalysezyklus transient als $\alpha\beta\beta$ Trimer vorliegt und vermutlich im Zuge der Freisetzung des Reaktionsproduktes Tryptophan in das α -Monomer und das $\beta\beta$ -Homodimer zerfällt.

Die Charakterisierung von in *S. solfataricus* überexprimiertem und gereinigtem sTrpB2i ergab keinerlei Hinweise auf posttranslationale Modifikationen, die das Komplexbildungsverhalten des nativen Enzyms beeinflussen könnten. In Übereinstimmung damit legt die Analyse des Assoziationszustands von sTrpB2i in Zellextrakten aus *S. solfataricus* nahe, dass auch *in vivo* die Bildung des Tryptophan Synthase Komplexes von der Bindung von Liganden abhängt.

Die physiologische Bedeutung der transienten, ligandenabhängigen Assoziation von sTrpA und sTrpB2i ist nicht verstanden. Es kann spekuliert werden, dass die beobachtete geringe Affinität von TrpB2i für sein Substrat Serin, die starke Abhängigkeit der Komplexbildung vom Sättigungsgrad mit Serin und die starke Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2i die Rate der Tryptophan Biosynthese eng an die cytosolische Verfügbarkeit von Serin koppelt. Ein derartiger Regulationsmechanismus könnte aus noch unbekannten Gründen einen Selektionsvorteil für *S. solfataricus* darstellen.

Das zweite Projekt dieser Arbeit behandelte die funktionelle Charakterisierung der außerhalb des *trp* Operons kodierten tmTrpB2o und sTrpB2a Enzyme. Dabei ergab die Untersuchung der rekombinanten Proteine und die Analyse von Zellextrakten aus *T. maritima* und *S. solfataricus*, dass tmTrpB2o und sTrpB2a selbst nach Zugabe von GP und Serin weder *in vitro* noch *in vivo* einen Komplex mit dem jeweiligen TrpA Enzym oder einem anderen, unbekannten Makromolekül ausbilden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass tmTrpB2o, sTrpB2a und weitere außerhalb des *trp* Operons kodierte TrpB2 Proteine eine andere physiologische Funktion als die Biosynthese von Tryptophan haben.

Um Hinweise auf diese Funktion zu erhalten, wurden $\Delta trpB2o$ und $\Delta trpB1$ Stämme des genetisch manipulierbaren hyperthermophilen Archaeons *Thermococcus kodakaraensis* hergestellt und ihr Wachstumsverhalten analysiert. Übereinstimmend mit der Hypothese einer alternativen Funktion, zeigte der $\Delta trpB2o$ Stamm keinen Phänotyp unter Tryptophan-Mangel, wohingegen der $\Delta trpB1$ Stamm unter diesen Bedingungen nicht überleben konnte. Mit tmTrpB2o und sTrpB2a durchgeführte *steady-state* enzymkinetischen Messungen ergaben Michaelis-Menten Konstanten im nanomolaren (K_M^{Indol}) bzw. millimolaren Bereich (K_M^{Ser}), die auf eine hohe Affinität für Indol und eine sehr niedrige Affinität für Serin hindeuten. Basierend auf diesen Daten wurde angenommen, dass die *in vivo* Funktion von Trp2o bzw. TrpB2a Proteinen im Umsatz von Indol oder einem Indolderivat mit einem zweiten unbekannten Substrat X zu einem fluoreszierenden Indolderivat Y besteht. Bei der Suche nach den Substanzen X und Y wurde der Gehalt an Indolderivaten von wildtypischem *T. kodakaraensis* und $\Delta trpB2o$ Zellen über *reversed phase* HPLC mit Fluoreszenzdetektion und LC-MS verglichen. Mehrere im Zellextrakt des $\Delta trpB2o$ Stammes akkumulierte Substanzen fehlten im wildtypischen Extrakt. Diese Komponenten - eine davon ist das als Pflanzenhormon bekannte Auxin - sind Kandidaten für das TrpB2o Substrat X. Dagegen wurden im Wachstumsmedium des wildtypischen Stammes vier durch *T. kodakaraensis* sezernierte Substanzen nachgewiesen, die im Medium des $\Delta trpB2o$ Stammes nicht detektierbar waren. Diese Komponenten, deren strukturelle Verwandtschaft mittels MS-MS Fragmentierungsstudien belegt wurde, stellen Kandidaten für das TrpB2o Produkt Y dar. Die Funktion der TrpB2o und TrpB2a Proteine sollte in Zukunft über die Identifizierung dieser Substanzen aufzuklären sein.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Protein-Protein Interaktionen

Proteine sind Polymere, die sich aus 20 chemisch und strukturell verschiedenen Bausteinen, den Aminosäuren, zusammensetzen und die zu spezifischen Tertiärstrukturen falten. Diese Komplexität ermöglicht es ihnen, mit nahezu jeder anderen Art von Molekülen zu interagieren, angefangen von kleinen organischen Substanzen, anorganischen Salzen und Metallen, über Zucker, Fettsäuren, Nukleotiden, Peptiden bis hin zu anderen Proteinen.

Die Ausbildung von spezifischen Protein-Protein Interaktionen spielt eine entscheidende Rolle bei den meisten biologischen Prozessen, wie Signaltransduktion, Zellregulation, der Immunantwort oder dem Metabolismus. Protein-Protein Interaktionen weisen, mit Dissoziationskonstanten von milli- bis femtomolar, stark unterschiedliche Stabilitäten auf. Trotz dieser großen Bandbreite zeichnen sich alle Wechselwirkungen durch eine hohe Spezifität zwischen den jeweiligen Partnern aus (Reichmann et al., 2007). Prinzipiell lassen sich Protein-Protein Interaktionen nach verschiedenen Aspekten klassifizieren (Nooren & Thornton, 2003a). So unterscheidet man Homo- und Heterooligomere, also die Wechselwirkung zwischen gleichen und unterschiedlichen Partnern, obligate und nicht-obligate Komplexe, wobei bei obligaten Komplexen die Protomere *in vivo* nicht in isolierter Form auftreten, und schließlich transiente und permanente Komplexe. Letztere zeichnen sich meist durch eine hohe Stabilität aus, wohingegen transiente Komplexe *in vivo* assoziieren und dissoziieren können, oft abhängig von der Bindung eines molekularen Auslösers.

Die strukturelle Analyse von Proteinkomplexen zeigte, dass die meisten Kontaktflächen größtenteils hydrophob, planar, globulär und relativ großflächig sind sowie eine gute Komplementarität von Form und Ladung aufweisen (Argos, 1988; Chothia & Janin, 1975; Janin, 1995; Janin, 1997; Jones & Thornton, 1996; Jones & Thornton, 1997). Allerdings wurde deutlich, dass oft nur wenige Aminosäurepaare, die sogenannten *hot spots*, für die Stabilität einer Interaktion verantwortlich sind. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich oft um konservierte, polare Residuen, die häufig durch ein Netzwerk aus hydrophoberen Resten vom Lösungsmittel abgeschirmt werden (Keskin et al., 2005). Die Kontaktflächen von transienten und permanenten Komplexen lassen sich nur schwer unterscheiden. Transiente Kontaktflächen sind häufig hydrophob und reich an aromatischen Aminosäuren, geladene Residuen treten eher selten auf (Lo Conte et al., 1999). Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Klassen in ihrer evolutionären Konserviertheit. Generell sind Kontaktflächenresiduen konservierter als Reste an anderen Stellen im Protein. Transiente

Kontaktflächen tendieren dazu, schneller zu evolvieren als permanente Kontaktflächen (Mintseris & Weng, 2005).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Protein-Proteinkomplexen, die am Metabolismus, also der Aufnahme, dem Transport und der chemischen Umwandlung von Stoffen in einem Organismus, beteiligt sind. Wesentlich für diesen Stoffwechsel sind Enzyme, die chemische Reaktionen katalysieren. Eine besonders effiziente Möglichkeit zur Koordination enzymatischer Reaktionen eines Stoffwechselweges ist die Bildung von Multienzymkomplexen. In diesen Komplexen können die Aktivitäten der beteiligten Enzyme abgestimmt und Reaktionsintermediate direkt zwischen den assoziierten aktiven Zentren transferiert werden, was die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht und unerwünschte Nebenreaktionen der Metabolite mit Stoffen aus dem umgebenden zellulären Milieu unterdrückt (Raushel et al., 2003).

1.2 Die Biosynthese von Tryptophan

Die Biosynthese der essentiellen Aminosäure Tryptophan ist ein den Mikroorganismen und höheren Pflanzen eigener Stoffwechselweg, Säugetiere müssen die Aminosäure über die Nahrung aufnehmen. Die Bildung von Tryptophan wird durch eine Abfolge mehrerer Multienzymkomplexe und monomerer Enzyme katalysiert. Seit einigen Jahren sind hochaufgelöste Röntgenstrukturen aller beteiligten Proteine dieses gut untersuchten Stoffwechselweges bekannt (Yanofsky, 2001; Yanofsky, 2003).

Der Ausgangspunkt für die Biosynthese des Tryptophans ist Chorismat, welches durch Kondensation von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat über mehrere Reaktionsschritte des Shikimat-Syntheseweges gebildet wird. Die einzelnen Reaktionen und die sie katalysierenden Enzyme sind in Abbildung 1 dargestellt.

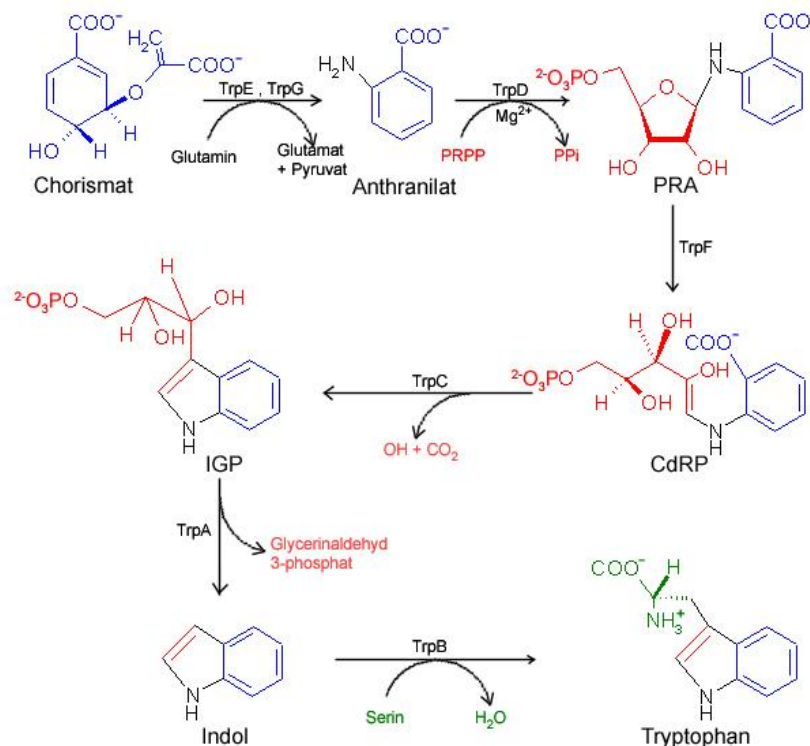


Abbildung 1: Reaktionen und Enzyme der Tryptophan Biosynthese.

PRA: N-(5'-Phosphoribosyl)anthranilat, CdRP: 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat, IGP: Indol-3-Glycerinphosphat, TrpE, TrpG: große und kleine Untereinheit der Anthranilat Synthase; TrpD: Anthranilat-Phosphoribosyltransferase; TrpF: PRA Isomerase; TrpC: IGP Synthase; TrpA: α-Untereinheit der Tryptophan Synthase; TrpB: β-Untereinheit der Tryptophan Synthase.

In den meisten prokaryotischen Organismen sind die sieben für die verschiedenen Enzyme codierenden Gene in Form des kanonischen *trp* Operons organisiert. Bei den im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden Organismen *Thermotoga maritima*, *Sulfolobus solfataricus* und *Thermococcus kodakaraensis* sind diese Gene ebenfalls in einem *trp* Operon organisiert (Abbildung 2), wobei das Operon in *T. kodakaraensis* zwar in zwei einzelne Einheiten fragmentiert ist, aber trotzdem als einzelne mRNA transkribiert wird (Tang et al., 1999).



Abbildung 2: Organisation des *trp* Operons bei den in dieser Arbeit verwendeten Organismen.

Auf die verwendete *trpB1/trpB2* Nomenklatur wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen. Die Abbildung wurde nach Merkl (2007) modifiziert.

Die Organisation des *trp* Operons ermöglicht eine gemeinsame Regulation auf Transkriptions- und Translationsebene. In *Escherichia coli* und anderen Mikroorganismen findet eine Transkriptionsregulation durch den Trp-Repressor und über Attenuation mittels eines Tryptophan-reichen *leader*-Peptids statt (Stewart & Yanofsky, 1986), dessen Synthese durch das Vorkommen beladener Tryptophanyl-tRNA ($\text{Trp-tRNA}^{\text{Trp}}$) reguliert wird (Xiu et al.,

2002). In Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* und *Lactococcus lactis* sind weitere Systeme zur transkriptionellen Regulation der Tryptophan Biosynthese bekannt, die ebenfalls auf Tryptophan-induzierter Attenuation bzw. einem *leader*-Peptid und der Ausbildung einer Antiterminator-Struktur basieren (Valbuzzi et al., 2002; Xie et al., 2002). Auch in den Archaeen *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Gast et al., 1994; Xie & Reeve, 2005) und *T. kodakaraensis* (Tang et al., 1999) sind transkriptionelle, Tryptophan-abhängige Regulationsmechanismen beschrieben.

Auf Enzymebene wird die Tryptophan Biosynthese durch *feedback*-Inhibition reguliert. So wird die TrpE Untereinheit des Multienzymkomplexes Anthranilat Synthase kompetitiv durch das Endprodukt des Synthesewegs, Tryptophan inhibiert (Knöchel et al., 1999). Das Produkt der TrpEG Reaktion ist Anthranilat, welches durch drei weitere Enzyme, die Anthranilat Phosphoribosyltransferase TrpD, die PRA-Isomerase TrpF und die IGP Synthase TrpC in IGP umgewandelt wird. Dieses ist das Substrat des Tryptophan Synthase Komplexes, welcher im Mittelpunkt dieser Arbeit steht.

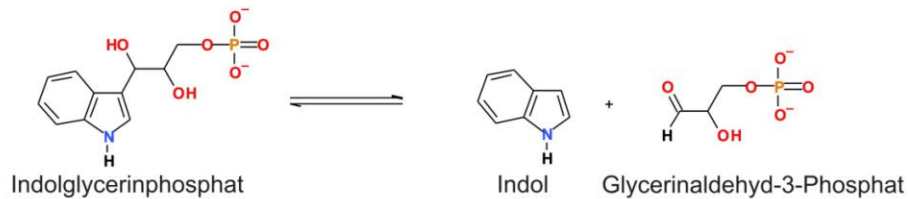
1.3 Die Tryptophan Synthase aus *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*

Die kanonische Tryptophan Synthase, wie sie beispielsweise in *S. typhimurium* oder *E. coli* gefunden wird, ist eines der am besten untersuchten Beispiele für die enge Kopplung von physikalischer Interaktion und Funktion innerhalb von Protein-Protein Komplexen (Huang et al., 2001; Miles et al., 1999; Raushel et al., 2003).

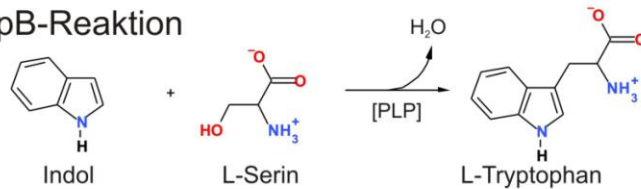
1.3.1 Struktur und Funktion

Die Tryptophan Synthase ist ein heterotetramerer $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplex, der die letzten beiden Schritte der Tryptophan Biosynthese katalysiert. Die isolierten TrpA und TrpB Untereinheiten liegen für sich als stabile α -Monomere bzw. β_2 Dimere vor (Creighton & Yanofsky, 1966). Obwohl die isolierten Enzyme die jeweiligen Teilreaktionen katalysieren können, werden beide Einzelreaktionen durch die Bildung des Komplexes wesentlich effizienter (Miles, 1979). In Abbildung 3 sind die Cofaktor-unabhängige TrpA-Teilreaktion, die Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) abhängige TrpB-Teilreaktion, sowie die Gesamtreaktion des Komplexes dargestellt.

TrpA-Reaktion



TrpB-Reaktion



Gesamtreaktion

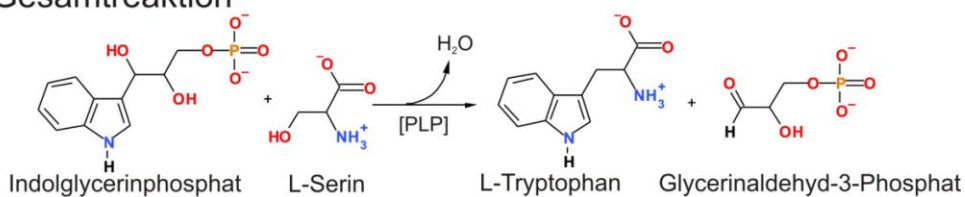


Abbildung 3: TrpA- und TrpB-Teilreaktionen und Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase.

Die Aufklärung einer Vielzahl von hochaufgelösten Röntgenkristallstrukturen der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* in An- und Abwesenheit verschiedener Liganden (Ahmed et al., 1987; Schneider et al., 1998) erlaubte es, die Architektur und Funktion des Komplexes näher zu charakterisieren (Abbildung 4).

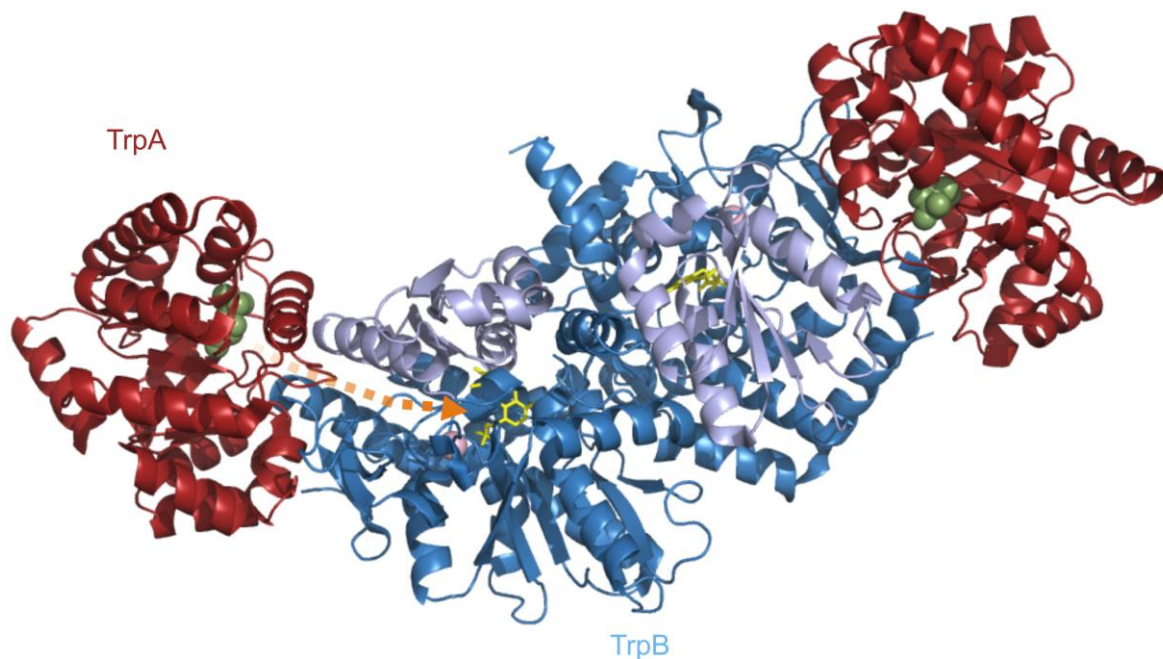


Abbildung 4: Struktur der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium*.

Dreidimensionale Struktur des $\alpha\beta\alpha$ Komplexes (pdb Eintrag 2J9X; Ngo et al., 2007) in Bänderdarstellung. Die TrpA Untereinheit ist rot und die TrpB Untereinheit blau dargestellt, mit hellen

und dunklen Tönen für die einzelnen Domänen. Das aktive Zentrum von TrpA ist durch den gebundenen Liganden Glycerin-3-Phosphat (GP, oliv) markiert, das aktive Zentrum von TrpB durch die Aminoacrylat-Form des an den Cofaktor PLP gebundenen Serins (gelb, siehe Abbildung 7). Die an TrpB gebundenen monovalenten Kationen (hier Cs^+) sind als pinke Sphären eingezeichnet. Der hydrophobe Kanal, durch den das Intermediat Indol zwischen den aktiven Zentren von TrpA und TrpB diffundiert, ist für ein $\alpha\beta$ Protomer als oranger Pfeil angedeutet.

Der gesamte Komplex hat eine Länge von 150 Å, wobei die TrpA und TrpB Untereinheiten in einer linearen $\alpha\beta\alpha$ Anordnung vorliegen. Die aktiven Zentren der assoziierten α - und β -Einheiten sind 25 Å voneinander entfernt.

Die TrpA Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa und besteht aus etwa 240 Aminosäuren. Sie weist eine $(\beta\alpha)_8$ -barrel Faltung auf, dem häufigsten bekannten Faltungstyp, der erstmals bei der Triosephosphat Isomerase gefunden wurde (Banner et al., 1976) und den etwa 10 % aller Proteine mit bekannter Raumstruktur aufweisen (Sternier & Höcker, 2005). Dieser Faltungstyp ist durch ein sich achtmal wiederholendes Motiv charakterisiert. Jedes Motiv besteht aus einem β -Faltblatt und einem α -Strang, die durch $\beta\alpha$ -loops miteinander verbunden sind. Die einzelnen Motive sind über $\alpha\beta$ -loops verknüpft. Die acht β -Stränge lagern sich zu einem zentralen parallelen Faltblatt zusammen, welches ein Fass- bzw. barrel bildet, das von den acht Helices umgeben ist. Das aktive Zentrum liegt, wie bei anderen $(\beta\alpha)_8$ -barrel Enzymen, an den Enden der β -Stränge und in den $\beta\alpha$ -loops. Zusätzlich besitzt TrpA drei helikale Segmente, α -Helix 0, α -Helix 2' und α -Helix 8', welche vor dem β -Strang 1 und zwischen dem β -Strang 2 und α -Helix 2 bzw. β -Strang 8 und α -Helix 8 liegen (Hyde et al., 1988; Vadrevu et al., 2003).

Die TrpB Untereinheit weist in ihrer dimeren Form ein Molekulargewicht von ungefähr 94 kDa auf und gehört innerhalb der Superfamilie der PLP-abhängigen Enzyme zur Faltungsklasse II (Grishin et al., 1995). Sie besteht aus zwei nahezu gleich großen Domänen (dunkelblau und hellblau in Abbildung 4). Das aktive Zentrum befindet sich an der Kontaktfläche dieser Domänen. Die N-terminale Domäne (dunkelblau) wird durch ein dreistufiges Helix-Faltblatt-Helix sandwich gebildet, welches von zwei Helices umgeben ist. Die C-terminale Domäne (hellblau) besteht aus einem zentralen β -Faltblatt, das zwischen zwei Schichten von α -Helices liegt.

Eine Besonderheit der Tryptophan Synthase stellt der intramolekulare, hydrophobe Kanal dar, der die aktiven Zentren von TrpA und TrpB verbindet und durch den das Produkt der TrpA-Reaktion, Indol, direkt zum aktiven Zentrum von TrpB geleitet wird und dort mit Serin zu Tryptophan kondensiert (Hyde et al., 1988). Das Auftreten intramolekularer Tunnel ist ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen. Weitere gut untersuchte Beispiele sind die Enzyme Carbamoylphosphat Synthetase, Asparagin Synthase und Imidazolglycerinphosphat Synthase (Beismann-Driemeyer & Sternier, 2001; Huang et al., 2001; Miles et al., 1999; Raushel et al., 2003).

Die Katalyse an den aktiven Zentren von TrpA und TrpB weist eine enge allosterische Kopplung auf, die über Konformationsänderungen vermittelt wird. Diese Konformationsänderung betrifft vor allem die sogenannte COMM Domäne (Gly 102-Gly189) in der β -Untereinheit und die flexiblen $\beta\alpha$ -loops 2 und 6 der α -Untereinheit (Rhee et al., 1997; Schneider et al., 1998). Beide Untereinheiten können offene Konformationen einnehmen, von denen angenommen wird, dass sie katalytisch inaktiv sind, oder geschlossene Konformationen, die die katalytisch aktiven Formen darstellen (Anderson et al., 1991; Dunn et al., 1990). Darüber hinaus findet sich in der TrpB Untereinheit der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* eine monovalente Kationenbindestelle in 8 Å Entfernung zum PLP Cofaktor (pinke Sphären in Abbildung 4). Abhängig von der Art des gebundenen Ions, können die Aktivität und das Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Konformation von TrpB verändert werden (Peracchi et al., 1995; Rhee et al., 1996). Dieses Konformationsgleichgewicht wird auch durch andere Faktoren verändert, wie der Bindung von TrpA- und TrpB-Liganden (Fan et al., 2000; Peracchi et al., 1996), dem pH-Wert (Mozzarelli et al., 1989; Peracchi et al., 1996), der Temperatur (Fan et al., 2000; Peracchi et al., 1996), organischen Lösungsmitteln (Ahmed & Miles, 1994) oder hydrostatischem Druck (Phillips et al., 2008a).

1.3.2 Katalysemechanismus der TrpA- und TrpB-Untereinheiten

TrpA ist ein genereller Säure-Base Katalysator, der die reversible Retro-Aldol Spaltung von IGP zu Indol und Glycerinaldehyd-3-phosphat katalysiert. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite von IGP (Weischet & Kirschner, 1976) und wird erst durch den von TrpB katalysierten Umsatz von Indol mit Serin in die physiologische Richtung verschoben. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 5 gezeigt.

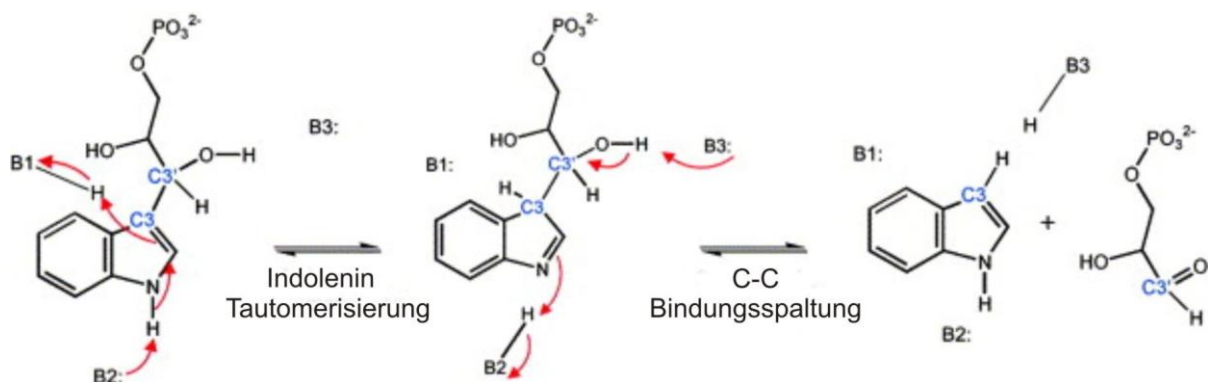


Abbildung 5: Mechanismus der TrpA-Reaktion.

In *S. typhimurium* übernimmt Asp60 die Funktion von B2, während Glu49 sowohl als B1-H als auch als B3 fungiert. Die Abbildung wurde nach Kulik et al. (2005) modifiziert.

Die Spaltung der C3'-C3-Bindung des IGP wird durch die Tautomerisierung des Indolrings zu einem Indolenin-Tautomer, einem Intermediat mit einem tetrahedralen Kohlenstoff an

Position 3, aktiviert. Die Tautomerisierung wird durch zwei katalytische Gruppen, B1-H und B2 begünstigt. Die Säure B1-H protoniert den Indolring an Position 3, während die Base B2 das Proton des Indolstickstoffs übernimmt. Die Bindungsspaltung wird durch eine zweite Base, B3, katalysiert, welche ein Proton von der C3' Hydroxylfunktion abzieht. Ausführliche Strukturuntersuchungen (Hyde et al., 1988; Kulik et al., 2005; Schneider et al., 1998) und Mutagenesestudien (Nagata et al., 1989; Yutani et al., 1987) zeigten, dass die TrpA-Reaktion durch das konzertierte Zusammenspiel von Glu49 und Asp60 vorangetrieben wird, wobei Asp60 als Base B2, Glu49 dagegen sowohl als Säure B1-H, als auch als Base B3 fungiert. Für die Aufklärung des TrpA Mechanismus spielten verschiedene Substrat-, Übergangszustands- und Produktanaloga, die z. T. Änderungen am aktiven Zentrum von TrpB induzieren und deshalb allosterische Liganden heißen, eine große Rolle. So zeigte die Struktur von TrpA mit dem gebundenen Übergangszustandsanalogon 1-(2'-Hydroxyphenylamino)-3-Glycerinphosphat (2-HGP) die Bifunktionalität von Glu49 (Abbildung 6). Zusätzlich induziert dieser Ligand die geschlossene Konformation des aktiven Zentrums von TrpA, indem es in Folge seiner Bindung zu einem Rearrangement der $\beta\alpha$ -loops 6 und 2 kommt.

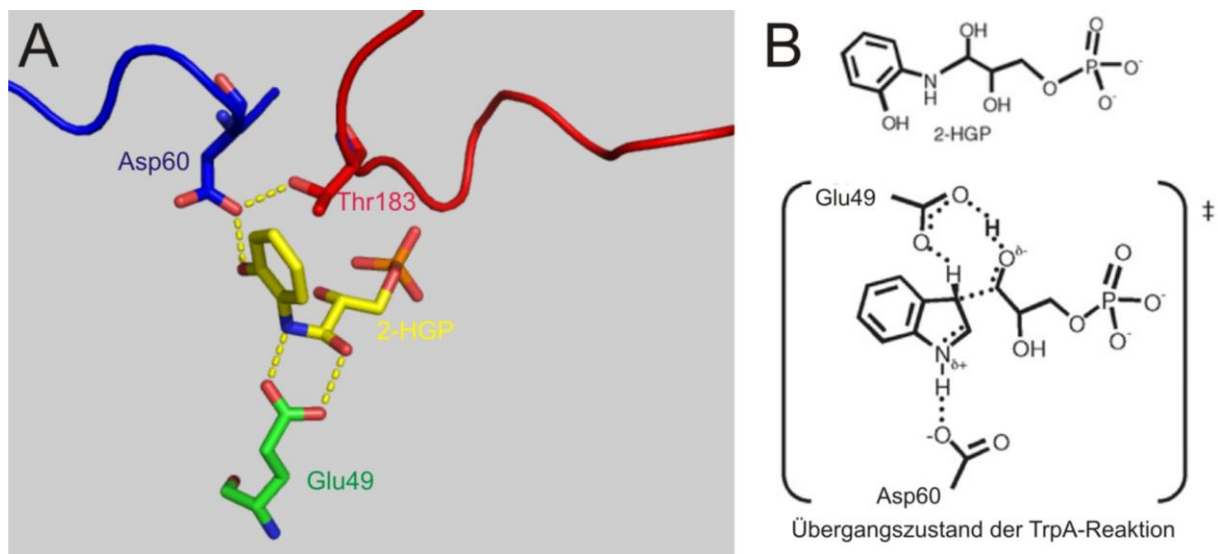


Abbildung 6: Struktur des aktiven Zentrums von TrpA aus *S. typhimurium* mit gebundenem Übergangszustandsanalogon 2-HGP.

A Ausschnitt aus der dreidimensionalen Struktur des $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplexes (pdb Eintrag 1TJP; Kulik et al., 2005). Das Übergangszustandsanalogon (gelb) wird durch die katalytischen Reste Asp60 und Glu49 komplexiert. Dabei bildet Glu49 sowohl Wasserstoffbrücken zum Stickstoff und der 3'-Hydroxylfunktion des Analogons, was auf die Bifunktionalität des Restes als allgemeine Säure und Base hindeutet. Loop 6 (rot, Reste 179 bis 193) bindet über eine Wasserstoffbrücke ausgehend von Thr183 an Asp60 in Loop 2 (blau, Reste 53 bis 60) und stabilisiert somit die geschlossene Konformation von TrpA. **B** Die Struktur von 2-HGP im Vergleich mit dem postulierten Übergangszustand der TrpA-Reaktion.

Die TrpB-Reaktion verläuft in mehreren Schritten (Drewe & Dunn, 1985), die sich zwei Stufen zuordnen lassen (Abbildung 7).

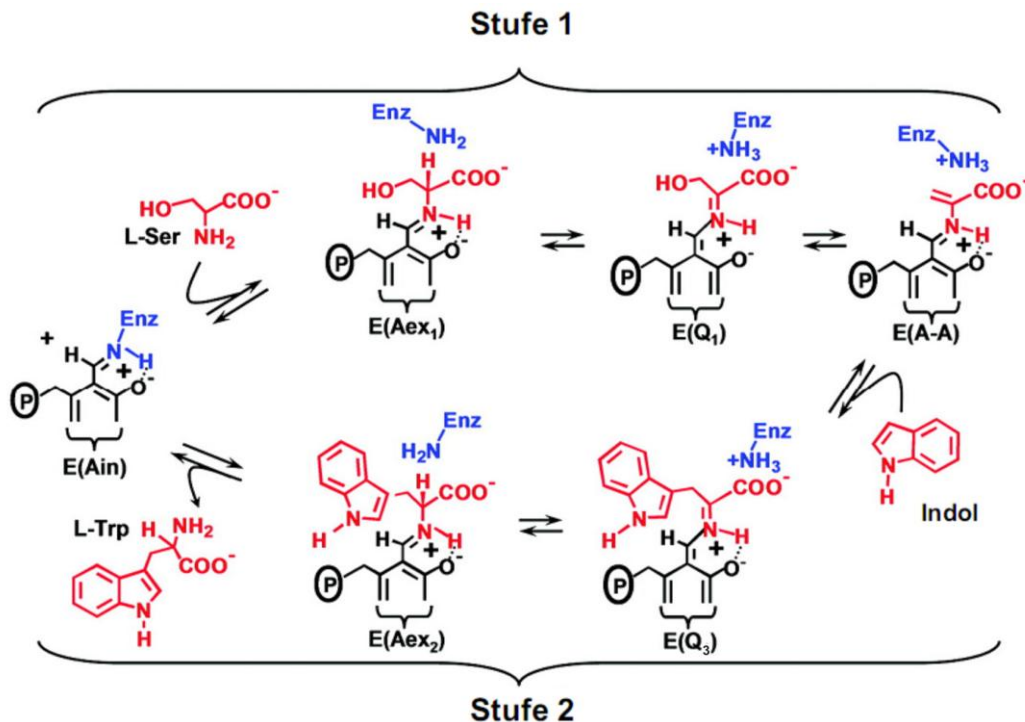


Abbildung 7: Mechanismus der TrpB-Reaktion.

Die Bildung von Tryptophan aus Indol und Serin verläuft in einer PLP-abhängigen Reaktion über eine Reihe von Intermediaten. Die einzelnen Reaktionen sind im Text beschrieben. Die Abbildung wurde nach Dierkers et al. (2009) modifiziert.

In Stufe 1, einer β -Eliminierung, reagiert Serin mit dem als internen Aldimin E(Ain) an den Lysinrest 87 gebundenen PLP-Cofaktor zum externen Aldimin E(Aex₁), welches über das Quinoidintermediat E(Q₁) schließlich unter Wasserabspaltung die Schiff'sche Base des α -Aminoacrylats E(A-A) bildet. In Stufe 2, einer β -Addition, greift das von der α -Untereinheit gebildete und durch den hydrophoben Kanal geleitete Indol nucleophil das α -Aminoacrylat E(A-A) an, um über die Quinoidintermediate E(Q₂) (nicht gezeigt) und E(Q₃) schließlich zum externen Aldimin des Tryptophan E(Aex₂) zu reagieren. Dieses wird schließlich freigesetzt und das interne Aldimin E(Ain) wird regeneriert. Die einzelnen Schritte der β -Reaktion sind reversibel und die Gleichgewichte können durch die bereits erwähnten allosterischen Liganden, monovalente Kationen und weitere Faktoren beeinflusst werden (Fan et al., 2000). So verschiebt etwa die Bindung verschiedener TrpA-Liganden das Gleichgewicht zwischen E(Aex₁) und E(A-A) zugunsten des letzteren Intermediats (Ngo et al., 2007). Auch die Bindung von TrpA an das freie TrpB Dimer, welches Serin gebunden hat, führt zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts (Jhee et al., 1998).

1.3.3 Allosterische Kommunikation der Untereinheiten während des Reaktionszyklus des $\alpha\beta\alpha$ Komplexes

Die durch TrpA-Liganden induzierte Gleichgewichtsverschiebung der PLP-Addukte am aktiven Zentrum von TrpB ist Basis einer ausgeprägten allosterischen Kommunikation

zwischen den beiden Untereinheiten der Tryptophan Synthase. Dies ermöglicht die Koordination der katalytischen Aktivitäten und verhindert den Verlust des Intermediats Indol. Dabei sind die verschiedenen Stufen des katalytischen Prozesses eng gekoppelt mit Konformationsänderungen an beiden Proteinen, von den offenen (inaktiven) hin zu den geschlossenen (aktiven) Formen (Osborne et al., 2003; Pan & Dunn, 1996) (Abbildung 8).

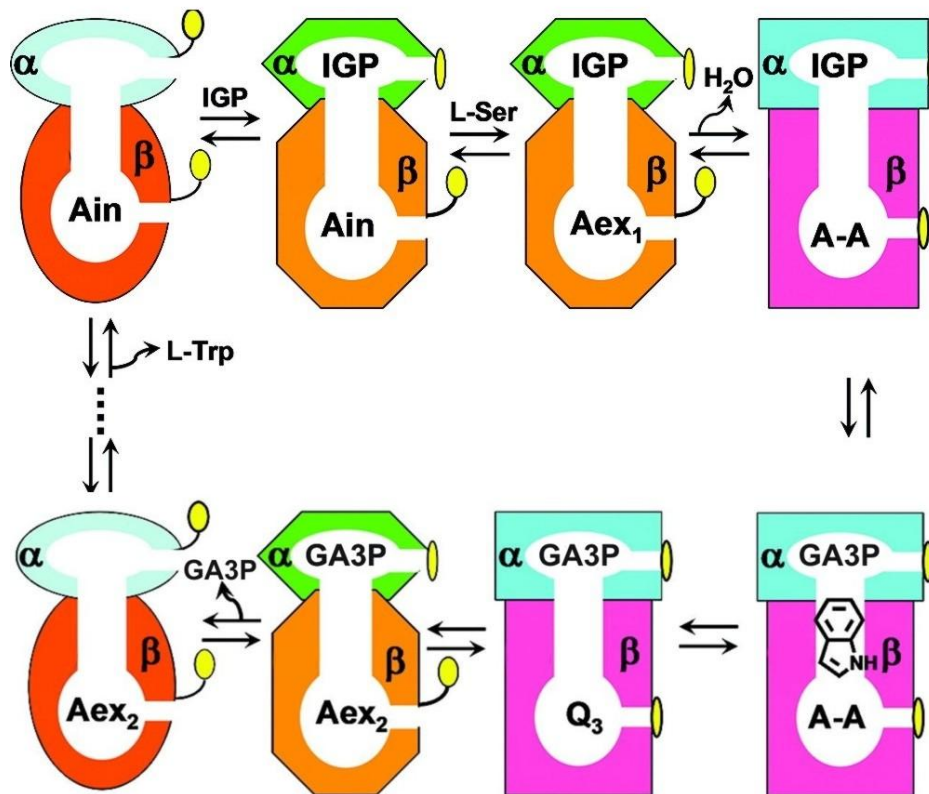


Abbildung 8: Reaktionszyklus der Tryptophan Synthase.

Schematische Darstellung eines $\alpha\beta$ Dimers des tetrameren $\alpha\beta\alpha$ Komplexes. Die einzelnen Katalysestufen sind gekoppelt mit offenen (elipsenförmig), teilweise geschlossenen (hexagonal und oktogonal) und geschlossenen (quadratisch) Konformationen der α - und β -Untereinheiten. Cyan (β) und magentafarbene (α) Untereinheiten sind aktiviert, Deckel, die die aktiven Zentren abschirmen, sind gelb dargestellt. Die Abbildung wurde nach Ngo et al. (2007) modifiziert.

Die Kommunikation innerhalb des Tryptophan Synthase Komplexes lässt sich in zwei Ebenen gliedern. Eine erste Ebene der Kommunikation zwischen den beiden Enzymen findet bereits bei der Bildung des tetrameren Komplexes aus den isolierten TrpA und TrpB Untereinheiten statt, die zu einer Erhöhung der Substrataffinitäten und der Geschwindigkeiten beider Teilreaktionen führt (Miles, 1979).

Die zweite Ebene der Kommunikation bestimmt die Feinjustierung der Gesamtreaktion des Komplexes. Die Bindung des Substrats IGP oder von Substratanaloga, wie z. B. Glycerin-3-phosphat (GP), Indolpropanolphosphat (IPP) oder Indolacetylglycin (IAG), an das aktive Zentrum von TrpA, stimuliert die Bindung von Serin durch TrpB (Dunn et al., 1990). Umgekehrt führt die Bildung des α -Aminoacrylats E(A-A) im aktiven Zentrum von TrpB zu einer 30-fachen Aktivierung der Indol-Produktionsrate von TrpA. Dagegen hat die Bildung

der Tryptophan Quinoid Spezies Q_3 eine Inaktivierung von TrpA zur Folge (Anderson et al., 1991; Brzovic et al., 1992).

Die beiden Ebenen der Kommunikation lassen sich verschiedenen Strukturelementen der Tryptophan Synthase zuordnen (Abbildung 9).

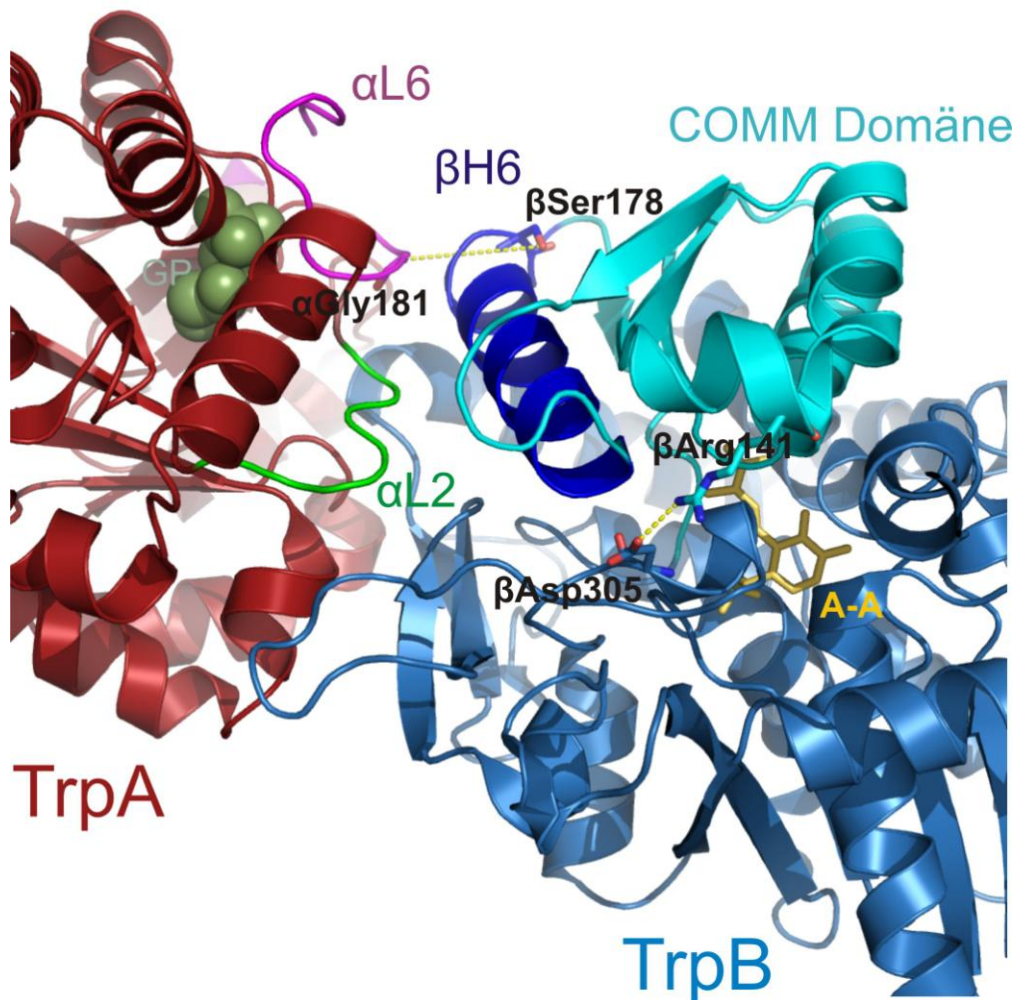


Abbildung 9: Strukturelle Elemente der allosterischen Kommunikation bei der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium*.

Gezeigt ist ein $\alpha\beta$ Dimer des $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplexes in der geschlossenen Konformation mit den Liganden Glycerin-3-Phosphat (GP, oliv) im aktiven Zentrum der TrpA Untereinheit (rot) und α -Aminoacrylat (A-A, gelb) im aktiven Zentrum der TrpB Untereinheit (blau) (pdb Eintrag 2J9X, Ngo et al. 2007). TrpA-Loop 6 (α L6, magenta) liegt über TrpA-loop 2 (α L2, grün) gefaltet und verschließt das aktive Zentrum von TrpA. Die COMM Domäne (cyan) von TrpB und insbesondere ihre Helix β H6 (tiefblau) mit dem Rest β Ser178 stellen zusammen mit α L6 mit dem Rest α Gly181 und α L2 die Schlüsselstrukturen der allosterischen Kommunikation zwischen den Untereinheiten dar. Eine Salzbrücke zwischen den Resten β Arg141 und β Asp305 stabilisiert die geschlossene Konformation von TrpB (Dunn et al., 2008).

Die erste Ebene der Kommunikation, also die Aktivierung durch Ausbildung des $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplexes, läuft über die COMM Domäne von TrpB, welche über die TrpB-Helix 6 (β H6) zahlreiche Interaktionen mit dem TrpA-loop 2 (α L2) ausbildet, der die katalytischen Reste von TrpA enthält (Schneider et al., 1998). Mutationen in dieser Kontaktfläche ändern die katalytischen Aktivitäten der TrpA und TrpB Untereinheiten, ohne die allosterische Interaktion

zu beeinflussen (Ogasahara et al., 1992; Rhee et al., 1998; Rowlett et al., 1998). Die zweite Ebene der Kommunikation ist eine allosterische Wechselwirkung zwischen den aktiven Zentren während des Katalysezyklus. Diese besteht hauptsächlich aus der Interaktion zwischen Gly181 in TrpA-*loop* 6 (α L6) und Ser178 in Helix β H6 (Schneider et al., 1998; Weyand et al., 2002a). In Abwesenheit von TrpA-Liganden liegt *loop* α L6 ungeordnet vor; erst durch Bindung von z.B. IPP, GP oder IAG stabilisiert sich der *loop* durch Ausformung einer Wasserstoffbrücke zwischen den beiden genannten Resten, wodurch die katalytischen Reste im aktiven Zentrum von TrpA in einer Konformation mit maximaler Aktivität fixiert werden. Durch diese ligandeninduzierte Konformationsänderung von TrpA wird die Affinität von TrpB für Serin erhöht und die geschlossene Konformation des aktiven Zentrums von TrpB induziert, bei der die beiden Domänen von TrpB relativ zueinander rotieren. Dies führt zu einer Aktivierung von TrpB, was die Akkumulation des α -Aminoacrylats E(A-A) gegenüber dem externen Aldimin E(Aex₁) bewirkt. Das Signal für diese Konformationsänderung wird von TrpA durch die Helix β H6 der COMM Domäne und eine Salzbrücke zwischen β Asp305 und β Arg141 weitergeleitet (Ngo et al., 2007).

Durch die Akkumulation des α -Aminoacrylats wird an der TrpA Untereinheit die Spaltung von IGP und damit die Produktion von Indol vorangetrieben (vgl. Abbildung 7). Nach Bildung des externen Aldimins von Tryptophan, also des Produkts der Gesamtreaktion, kehrt TrpB in die offene Ausgangskonformation zurück, wodurch auch die Verbindungen der COMM Domäne mit *loop* α L6 der TrpA Untereinheit gelöst werden. Dies führt zur Destabilisierung der geschlossenen, aktiven Konformation von TrpA welches wieder in den offenen, inaktiven Ausgangszustand übergeht (Brzovic et al., 1992; Leja et al., 1995; Pan et al., 1997).

1.4 Die Evolution der Tryptophan Synthasen: Eine neue Klasse von TrpB Enzymen

Der oben beschriebene Reaktionszyklus der beiden Untereinheiten der Tryptophan Synthase ist eines der am besten untersuchten Beispiele für die enge Kopplung von physikalischer Interaktion und Funktion innerhalb von Multienzymkomplexen (Huang et al., 2001; Miles et al., 1999; Raushel et al., 2003)

Vor diesem Hintergrund erscheint es zunächst überraschend, dass sich in den Genomen einer Reihe von Mikroorganismen zwei *trpB* Gene identifiziert wurden, *trpB1* und *trpB2* (Hettwer & Sterner, 2002; Xie et al., 2002). Die von den *trpB2* Genen kodierten TrpB2 Proteine werden in der COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) Datenbank (Tatusov et al., 2003) als alternative Tryptophan Synthase β -Untereinheit (COG 1350) klassifiziert, die von den *trpB1* Genen kodierten TrpB1 Proteine dagegen als die „klassische“ Tryptophan Synthase (COG 0133) geführt. Die phylogenetische Analyse der TrpB

Sequenzen zeigt, dass die TrpB1 und die TrpB2 Proteine zwei distinkte Gruppen bilden, wobei sich die TrpB2 Gruppe in weitere Untergruppen (TrpB2i, TrpB2o und TrpB2a) untergliedert (Abbildung 10 A).

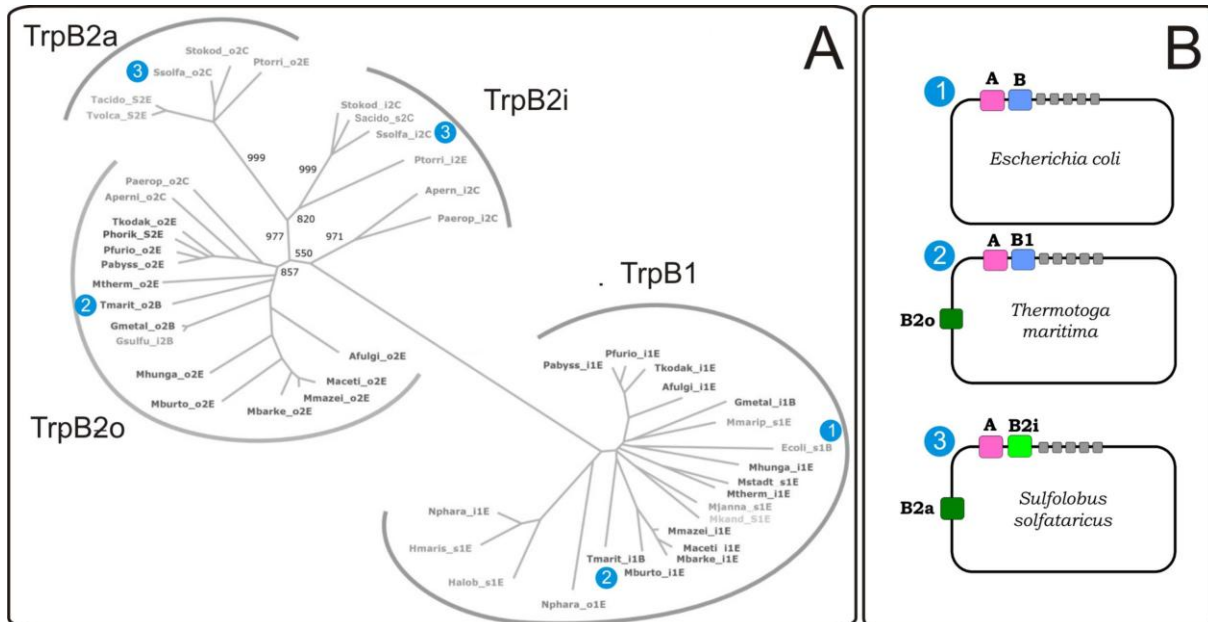


Abbildung 10: Phylogenetischer Baum von TrpB Sequenzen (A) und Operonorganisation der trpA, trpB1 und trpB2 Gene (B).

A Unter Verwendung von archaischen und bakteriellen TrpB Sequenzen wurde ein multiples Sequenzalignment erstellt und daraus ein ungewurzelter phylogenetischer Baum berechnet (Abbildung modifiziert nach Merkl, 2007). Die Proteine sind nach einer von Merkl (2007) eingeführten Nomenklatur benannt, welche gemeinsam mit den Akronymen für die Spezies in Anhang 6.1 erläutert wird. Zwei distinkte Unterbäume, TrpB1 und TrpB2 sind erkennbar, wobei sich TrpB2 in drei weitere Unterbäume, TrpB2i, TrpB2o und TrpB2a differenziert. **B** Operonorganisation der trpA, trpB1 und trpB2 Gene. Die Differenzierung des phylogenetischen Baumes spiegelt sich in der Lokalisation der Gene innerhalb und außerhalb des trp Operons wider. TrpB1 Proteine sind nahezu ausschließlich Teil des trp Operons ①, TrpB2o Proteine sind alle außerhalb des Operons codiert, wobei sie fast ausschließlich gemeinsam mit einem Operon-basierten TrpB1 vorkommen ②. TrpB2i Proteine sind innerhalb des Operons codiert. Jedes dieser Gene tritt gemeinsam mit einem nicht Operon-basierten trpB2 auf ③. TrpB2a Sequenzen treten nur in Genomen auf, die ein einzelnes trpB2 Gen haben, oder als zweites trpB2 Gen außerhalb des Operons in Kombination mit einem trpB2i Gen.

Die Vertreter der Gruppe trpB2o (*outside of the operon*) sind außerhalb des trp Operons lokalisiert, die der Gruppe trpB2i (*inside of the operon*) liegen innerhalb des trp Operons. Die letzte Gruppe trpB2a (*ancient*) setzt sich aus Sequenzen zusammen, die außerhalb des trp Operons liegen und die zu Spezies gehören, die kein trpB1 besitzen (Abbildung 10 B). TrpB1 und TrpB2 Proteine aus verschiedenen Organismen weisen innerhalb der jeweiligen Gruppe eine Sequenzähnlichkeit von ca. 60 % auf, wohingegen die Sequenzähnlichkeit zwischen den beiden Gruppen nur 30 % beträgt (Xie et al., 2002). Die meisten mesophilen Prokaryoten haben ein einzelnes Operon-basiertes trpB1 Gen. Auffallend ist, dass trpB2 fast ausschließlich bei thermophilen und hyperthermophilen Organismen, sowohl Archaeen als auch Bakterien, auftritt (Merkl, 2007), wenn auch bei höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Zea mays* entsprechende trpB2 Gene gefunden wurden (Xie et al., 2002).

Vergleicht man das Auftreten von *trpB* Genen in allen komplett sequenzierten Archaeen, so ist mit 10 aus 26 Spezies die häufigste Kombination ein Operon-basiertes *trpB1* und ein nicht Operon-basiertes *trpB2* Gen. Organismen aus der Klasse der *Crenarchaeota* weisen ausschließlich *trpB2* Gene auf (Merkl, 2007).

Vergleicht man die Sequenzen von TrpB1 und TrpB2 Proteinen über multiple Sequenzalignments im Detail (Merkl, 2007), so zeigt sich, dass die Hauptunterschiede auf größeren Indels (Deletionen oder Insertionen) beruhen (Abbildung 11). Die meisten Reste mit direktem Ligandenkontakt in den bekannten TrpB1 Strukturen und die Reste im aktiven Zentrum sind in allen TrpB1 und TrpB2 Proteinen strikt konserviert. Die Reste des aktiven Zentrums His81, Lys82 (Bindestelle des PLP Cofaktors, Zählweise nach *Pyrococcus furiosus* TrpB1) und Ser371 sind strikt konserviert. Dagegen ist Lys162 nur in TrpB1 Proteinen strikt konserviert und der Rest Asp 300 in TrpB1 ist in TrpB2 Sequenzen durch ein Arginin ersetzt. Mehrere Reste in der Kontaktfläche, in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum oder in der Nähe von Ligandenbindestellen weisen ein bimodales Auftreten auf, durch das sich TrpB1 und TrpB2 deutlich unterscheiden (Merkl, 2007).

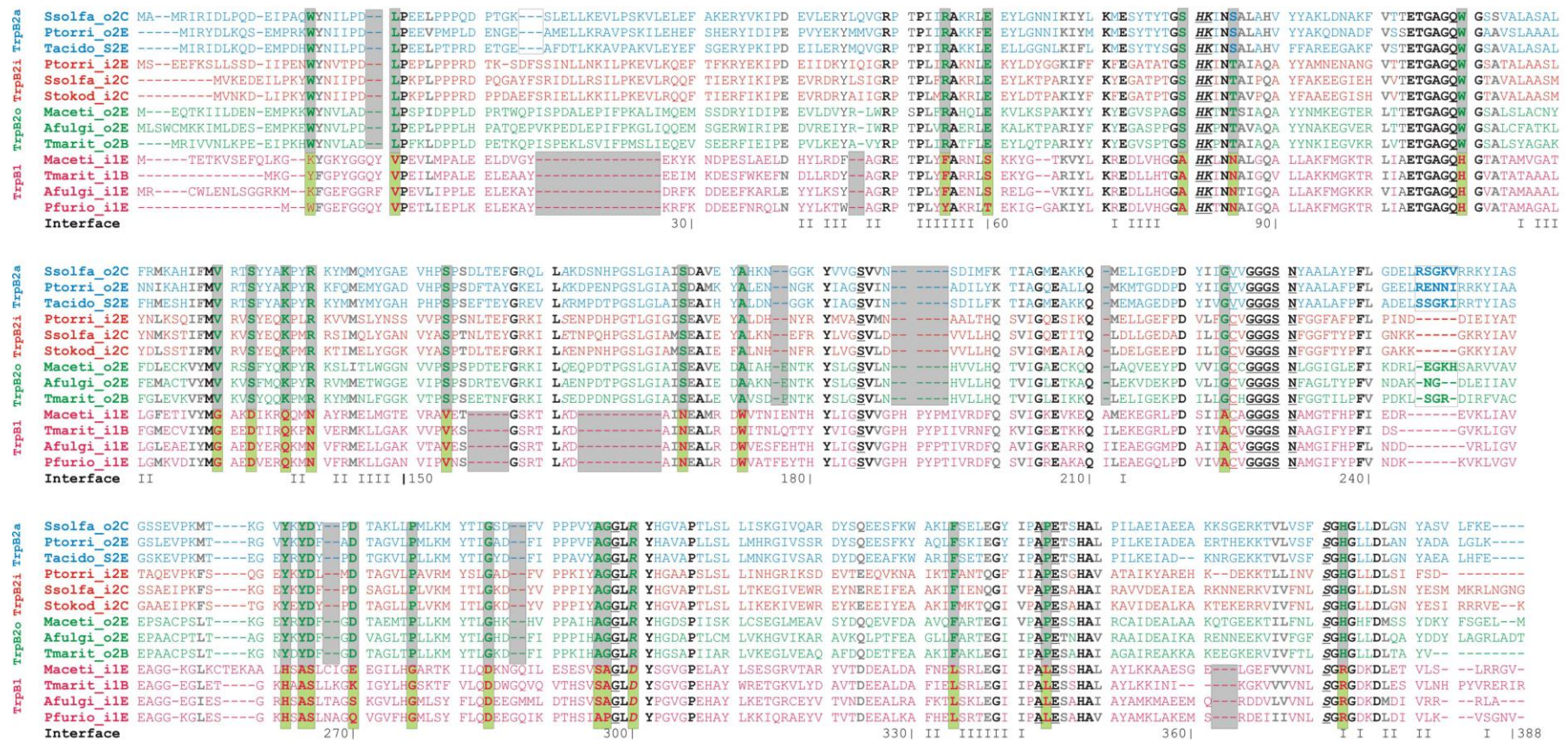


Abbildung 11: Multiples Sequenzalignment von TrpB Sequenzen.

Alignment von Vertretern der vier TrpB Sequenzklassen TrpB1 (magenta), TrpB2o (grün), TrpB2i (rot) und TrpB2a (blau). Residuen, die in TrpB1 aus *P. furiosus* Kontakte zu TrpA ausbilden (PDB Eintrag 1WDW), sind in der Zeile *Interface* hervorgehoben. Fett gedruckte Residuen sind konserviert, schwarze strikt, graue weniger strikt. Reste im aktiven Zentrum sind kursiv dargestellt, Reste mit Ligandenkontakten sind unterstrichen. Residuen bzw. Indels, die charakteristisch für TrpB1 bzw. TrpB2 sind, sind in grauen Kästen eingefasst. Die Nummerierung der Residuen bezieht sich auf TrpB1 aus *P. furiosus*. Die Abbildung wurde nach Merkl (2007) modifiziert.

Um zu überprüfen, wie sich die TrpB2 Proteine gegenüber ihren entsprechenden TrpA Partnern verhalten, wurden TrpA, TrpB1, TrpB2i, TrpB2o und TrpB2a Proteine aus den hyperthermophilen Prokaryoten *T. maritima* (ein Operon-basiertes *trpB1* und ein nicht-Operon-basiertes *trpB2o* Gen, Abbildung 10 B) und *S. solfataricus* (ein Operon-basiertes *trpB2i* und ein nicht-Operon-basiertes *trpB2a* Gen, Abbildung 10 C) in *E. coli* rekombinant exprimiert, gereinigt und bezüglich ihres Komplexbildungsverhaltens und ihrer allosterischen Kommunikation charakterisiert (Hettwer & Sterner, 2002; Leopoldseder et al., 2006). Darüber hinaus wurde die Röntgenkristallstruktur von TrpB2a aus *S. solfataricus* in Kooperation mit Prof. Olga Mayans (Universität Liverpool, unpublizierte Daten) gelöst.

Betrachtet man die Enzyme aus *T. maritima*, so bildet tmTrpA das erwartete α -Monomer und sowohl tmTrpB1 als auch tmTrpB2o bilden das erwartete $\beta\beta$ -Homodimer. Beide TrpB Enzyme katalysieren die Tryptophan Synthase B-Reaktion, wobei sich tmTrpB2 durch einen auffallend niedrigen K_M^{Indol} ($<0,77 \mu\text{M}$) auszeichnet. Jedoch assoziiert nur das Operon-basierte tmTrpB1, aber nicht tmTrpB2o, mit tmTrpA, um den kanonischen $\alpha\beta\alpha$ Tryptophan Synthase Komplex auszubilden. In diesem Komplex aktivieren sich beide Untereinheiten gegenseitig, wobei die katalytische Effizienz $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{IGP}}$ von tmTrpA um den Faktor 270 gesteigert wird. Die Steigerung der katalytischen Effizienz von tmTrpB1 als Folge der Komplexbildung beruht hauptsächlich auf der Absenkung des K_M^{Ser} um den Faktor 65 auf einen Wert von ca. 5 mM. Die fehlende funktionale Interaktion von tmTrpB2o mit tmTrpA spiegelt sich auch darin wider, dass der K_M^{Ser} auch in Anwesenheit von tmTrpA unverändert bei ca. 50 mM liegt. Zur Identifizierung der für das unterschiedliche Komplexbildungsverhalten tmTrpB1 und tmTrpB2 verantwortlichen Strukturelemente wurden mehrere Sequenzabschnitte, die Insertionen in tmTrpB2 darstellen und einzelne Aminosäuren wechselseitig zwischen beiden Enzymen ausgetauscht. Es zeigte sich, dass die Affinität der tmTrpB1 Varianten zu tmTrpA dadurch um mehrere Größenordnungen verringert wurde, aber kein stabiler Komplex aus den tmTrpB2 Mutanten und tmTrpA hergestellt werden konnte (Bolz, 2006; Schwabe, 2007).

Um zu überprüfen, ob die fehlende Komplexbildung mit TrpA eine generelle Eigenschaft der TrpB2 Proteine ist, wurden sTrpA, sTrpB2i und sTrpB2a aus *S. solfataricus* untersucht (Leopoldseder et al., 2006). Es zeigte sich, dass auch hier sTrpA als α -Monomer bzw. sTrpB2i und sTrpB2a als $\beta\beta$ -Homodimere vorliegen. Die beiden sTrpB2-Enzyme zeichneten sich, ähnlich wie tmTrpB2o, durch niedrige K_M^{Indol} -Werte im unteren μM -Bereich und hohe K_M^{Ser} Werte im mM-Bereich aus. Durch analytische Gelfiltrationsexperimente und Gleichgewichtssedimentationsläufe konnte weder für sTrpB2i noch für sTrpB2a eine Komplexbildung mit sTrpA nachgewiesen werden. Trotzdem erhöht sTrpB2i die Aktivität von sTrpA in *steady-state* enzymkinetischen Messungen bis zu 300-fach. Jedoch verläuft die Aktivierung, im Gegensatz zu den kanonischen Tryptophan Synthasen, unidirektional, d.h.

sTrpB2i wird durch sTrpA nicht stimuliert. Analoge Messungen mit sTrpB2a zeigten in keiner Richtung messbare Aktivierung. Somit zeigt auch das außerhalb des *trp* Operons codierte sTrpB2a, wie tmTrpB2o, keine physikalische oder funktionelle Interaktion mit TrpA.

Die über Aktivitätstitration bei 65 °C ermittelte apparente Dissoziationskonstante von 280 nM für den Komplex aus sTrpA und sTrpB2i in Anwesenheit von IGP und Serin ist deutlich höher als in vergleichbaren Messungen mit den kanonischen Tryptophan Synthasen aus *T. maritima* (4 nM bei 65 °C) und *E. coli* (1,85 nM bei 37 °C) (Creighton & Yanofsky, 1966; Leopoldseder et al., 2006). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass sTrpB2i einen nur während der Katalyse ausgebildeten, d. h. transienten Komplex mit sTrpA formt, der sich durch eine relativ schwache Affinität der beiden Proteine zueinander auszeichnet.

Daraus wurde ein Modell für die Evolution der Tryptophan Synthase abgeleitet. Dieses schlägt vor, dass das Komplexbildungsverhalten von TrpB2o (bzw. TrpB2a), TrpB2i und TrpB1 die schrittweise Zunahme der TrpB Affinität zu TrpA und die Verfeinerung der funktionellen Interaktion widerspiegeln, welche mit der Co-Lokalisation der codierenden Gene im *trp* Operon einhergeht (Leopoldseder et al., 2006; Merkl, 2007). Wegen der fehlenden funktionellen Interaktion mit TrpA und dem gleichzeitigen Auftreten von TrpB1 und TrpB2o in vielen Organismen, wird angenommen, dass TrpB2o/TrpB2a eine andere physiologische Funktion als Synthese die von Tryptophan hat.

Der strukturelle Vergleich von sTrpB2a und TrpB1 aus *P. furiosus* (pfTrpB1) zeigt, dass die Hauptunterschiede zwischen den beiden Enzymfamilien in den Regionen liegen, die in TrpB1 dem assoziierten TrpA zugewandt sind (Abbildung 12).

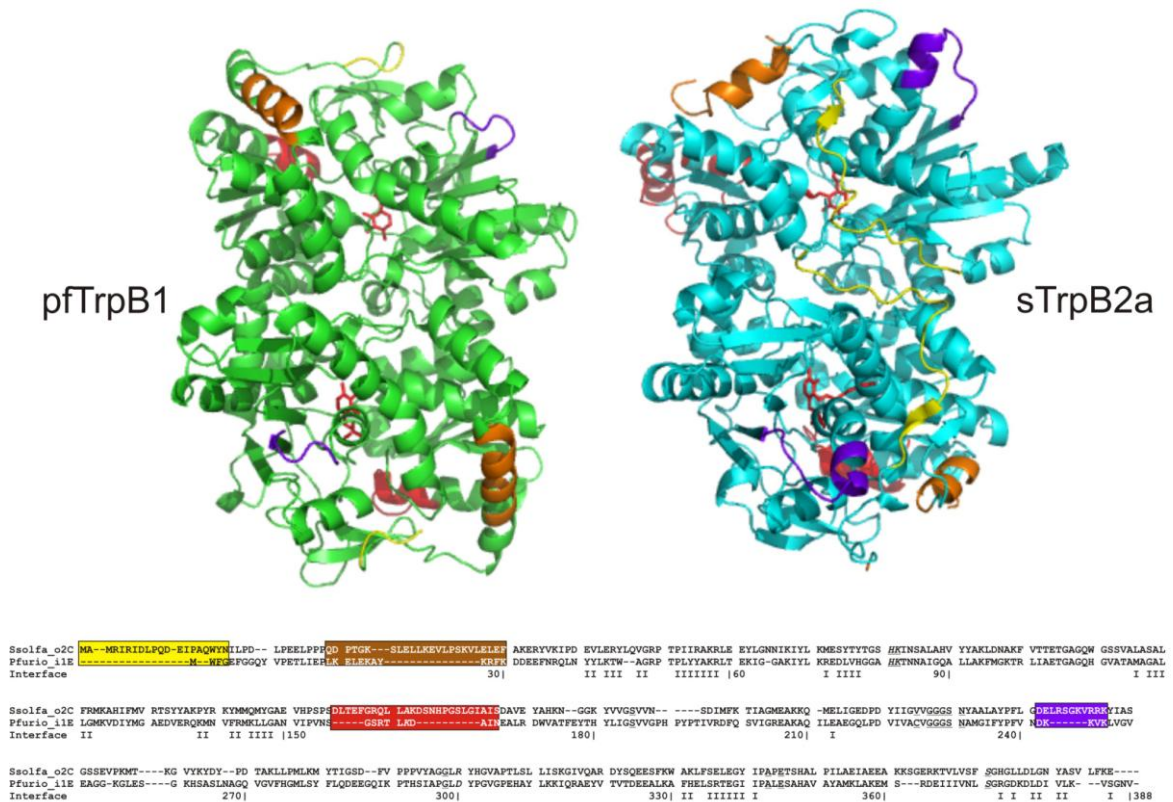


Abbildung 12: Struktureller Vergleich von sTrpB2a und pTrpB1.

Gezeigt sind die β_2 Dimere von pTrpB1 (grün, pdb Eintrag 1V8Z) und sTrpB2a (cyan, unveröffentlichte Daten, Prof. Dr. Olga Mayans, Universität Liverpool). Farblich markierte Bereiche stellen Insertionen in sTrpB2a dar, die im Sequenzalignment entsprechend markiert sind (unten, Teilalignment aus Abbildung 11). Die Kontaktflächen zu TrpA in pTrpB1 befinden sich jeweils am oberen und unteren Ende der Struktur. Die aktiven Zentren sind jeweils durch den Cofaktor PLP hervorgehoben (rote Moleküldarstellung).

Die Insertionen in der sTrpB2a Sequenz, die im multiplen Sequenzalignment farblich markiert sind, liegen alle nahe der Region, die die Kontaktfläche zwischen pTrpB1 und pTrpA bildet. Lediglich die N-terminale Extension von sTrpB2a (gelb) befindet sich an der Kontaktfläche der beiden β -Untereinheiten. Es wurde angenommen, dass diese Insertionen die Ursache für die fehlende Komplexbildung mit sTrpA darstellen (Leopoldseder et al., 2006). Die Gesamtstruktur, Domänenorganisation und Zusammensetzung des aktiven Zentrums ist bei pTrpB1 und sTrpB2a dagegen sehr ähnlich, was für identische Katalysemeechanismen in beiden Familien spricht. Durch das Fehlen offensichtlicher struktureller Unterschiede im aktiven Zentrum kann nicht direkt auf die physiologisch katalysierte Reaktion von TrpB2o/TrpB2a geschlossen werden.

1.5 Die hyperthermophilen Prokaryoten *Thermotoga maritima*, *Sulfolobus solfataricus* und *Thermococcus kodakaraensis*

Für die Funktionsuntersuchungen der verschiedenen TrpB und TrpA Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit drei Spezies kultiviert, die verschiedene Organisationsstufen der *trpB* Proteine aufweisen.

Das hyperthermophile Bakterium *T. maritima* ist einer der wenigen bekannten Vertreter der *Bacteria*, der bei extrem hohen Temperaturen lebensfähig ist. Bei diesem Organismus, der vor 20 Jahren in unterseeischen hydrothermalen Quellen vor Italien und den Azoren gefunden wurde (Huber et al., 1986), handelt es sich um einen strikt anaerobes, gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium mit einem Wachstumsoptimum bei 80°C. Die Zelle ist durch eine auffällige, scheidenförmige Hülle, die „Toga“, umgeben. *T. maritima* ist ein gärender Chemoorganotropher, der Zucker und Kohlenhydratpolymere wie z. B. Stärke abbaut und dabei Acetat, CO₂ und Wasserstoff erzeugt. Die Genomsequenzierung von *T. maritima* zeigte, dass einige Gene wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer von hyperthermophilen *Archaea*-Arten auf diesen Organismus übergegangen sind. Bei diesem lateralen Genaustausch wurden viele Gene, die für das Überleben unter extremen Bedingungen nützlich sind, aufgenommen (Nelson et al., 1999). Bezüglich der Organisationsstufe der TrpA und TrpB Proteine, weist *T. maritima* ein zu *trpA* benachbartes Operon-ständiges *trpB1* Gen und ein nicht Operon-ständiges *trpB2o* Gen auf (Abbildung 10 B).

S. solfataricus ist ein hyperthermophiles Archaeon, das hauptsächlich in heißen Quellen in Gebieten mit vulkanischer Aktivität, z. B. im Yellowstone Nationalpark, in Island oder Italien, gefunden wird. Der Organismus aus dem Phylum der *Crenarchaeota* wächst in schwefelreichen, sauren, heißen Quellen mit einem Wachstumsoptimum von 75 bis 80 °C und pH-Werten zwischen 2 und 4. Er hält mit einem cytosolischen pH von ungefähr 6,5 einen starken pH Gradienten über die Cytoplasmamembran aufrecht (Moll & Schäfer, 1988). *S. solfataricus* ist ein aerober Chemolithotropher, der H₂S oder S⁰ zu H₂SO₄ oxidiert und CO₂ als Kohlenstoffquelle nutzt. Er kann in Abwesenheit von S⁰ aber auch chemoorganotroph wachsen, wobei verschiedene organische Verbindungen, wie Kohlenhydrate und Peptide verstoffwechselt werden können. Die Sequenzierung des Genoms von *S. solfataricus* (She et al., 2001) zeigte, dass der Organismus kein *trpB1* Gen, dafür aber ein Operon-ständiges *trpB2i* Gen und ein nicht Operon-ständiges *trpB2a* Gen aufweist (Abbildung 10 B).

T. kodakaraensis gehört zur euryarchaeotischen Ordnung der Thermococcales. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm KOD1 wurde in Solfataren an der Küste der japanischen Insel Kodakara entdeckt (Morikawa et al., 1994). Die bei 85 °C optimal wachsenden Zellen sind obligat anaerobe, chemolithotrophe Hyperthermophile mit fermentativem Metabolismus, die organische Substrate wie Peptide, Polysaccharide oder

andere Zucker als Kohlenstoffquelle nutzen. In Anwesenheit von Schwefel wird dieser als terminaler Elektronenakzeptor genutzt und zu H_2S reduziert. Der Stamm KOD1 (Atomi et al., 2004) wächst in Anwesenheit von S^0 in komplexen Medien mit Zusätzen wie Trypton, Pepton oder Hefeextrakt, aber auch in einem definierten Minimalmedium, bei dem freie Aminosäuren als einzige Kohlenstoffquelle dienen. In Anwesenheit von Pyruvat, Stärke und Hefeextrakt ist auch Wachstum ohne S^0 möglich. Die Sequenzierung des Genoms von *T. kodakaraensis* (Fukui et al., 2005) zeigte, dass der Organismus analog zu *T. maritima* ein Operon-basiertes *trpB1* Gen und ein nicht Operon-ständiges *trpB2o* Gen aufweist.

Für *T. kodakaraensis* wurde ein System zur gezielten Deletion von Genen entwickelt, das auf dem Prinzip der homologen Rekombination beruht (Sato et al., 2005).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Klasse der TrpB2 Enzyme weiter charakterisiert. Im ersten Themenkomplex sollte insbesondere das ungewöhnliche Komplexbildungsverhalten von sTrpB2i untersucht werden, dessen Interaktion mit sTrpA bisher nur im Rahmen von Aktivitätstitrationen nachgewiesen werden konnte (Leopoldseder et al., 2006). Konkret sollten folgende Fragen beantwortet werden: Unter welchen Bedingungen liegt ein stabiler Komplex aus sTrpA und sTrpB2i vor? Können diese Bedingungen mit dem Reaktionszyklus der aktiven Zentren korreliert werden? Welche Architektur weist der Komplex auf?

Diese Fragestellungen sollten durch biophysikalische Charakterisierung der Enzyme in Anwesenheit verschiedener Substrat-, Übergangszustands- und Produktanaloga untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, ob die Interaktion zwischen sTrpA und sTrpB2i auch *in vivo* transients Natur ist. Die Ergebnisse zu diesem Themenkomplex finden sich in Kapitel 4.1.

Der zweite Themenkomplex dieser Arbeit behandelt die die physiologische Funktion von nicht Operon-ständigen TrpB2 Enzymen (TrpB2a, TrpB2o), welche keinerlei funktionale oder physikalische Interaktion mit den jeweiligen TrpA Proteinen zeigen. Es wird angenommen, dass diese Enzyme eine andere, noch unbekannte Funktion als die Synthese von Tryptophan haben. Um diese Funktion aufzuklären, sollten *T. kodakaraensis* Stämme mit Deletion des *trpB2* bzw. *trpB1* Gens hergestellt und sowohl phänotypisch als auch bezüglich ihrer Metabolit-Zusammensetzung charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, ob TrpB2o Interaktionen mit anderen, noch unbekannten Proteinen eingeht und ob diese Wechselwirkungen weitere Informationen über die physiologische Funktion liefern können. Die Ergebnisse zu diesem Themenkomplex finden sich in Kapitel 4.2.

2 Material

2.1 Bakterien- und Archaeenstämme

Klonierungsstämme

***E. coli* DH5 α** (Hanahan, 1983)

F⁻, *endA1*, *hsdR17* (r_k⁻m_k⁻), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal^r), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*) U169, Φ 80, *lacZ* Δ M15

***E. coli* NEB5 α** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

fhuA2, Δ (*argF-lacZ*)U169, *phoA*, *glnV44*, Φ 80, Δ (*lacZ*)M15, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17*

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* DH5 α Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor auf der Zelloberfläche, was verhindert, dass der Bacteriophage T1, der an diesen Rezeptor bindet, die Zellen befällt. Somit sind diese Zellen T1-phagenresistent.

***E. coli* ElectroMAX Stbl4** (INVITROGEN, Karlsruhe)

mcrA *D*(*mcrBC-hsdRMS-mrr*) *recA1* *endA1* *gyrA96* *gal*- *thi-1* *supE44* λ - *relA1* *D*(*lac-proAB*)/F' *proAB*⁺ *lacI*^q *ZDM15* Tn10 (*Tet*^R)

Diese kommerziell erhältlichen, elektrokompenten Zellen sind vom Stamm JM109 abgeleitet. Sie eignen sich besonders für die Klonierung von instabilen Inserts wie retroviralen Sequenzen oder *direct repeats*. In der vorliegenden Arbeit wurden sie zur Klonierung von Genen in den Virusvektor pMJ05 verwendet.

***E. coli* NEBTurbo** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

F⁺, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, Δ (*lacZ*)M15/*fhuA2*, Δ (*lac-proAB*), *glnV*, *gal* R(*zgb-210::Tn10*), Tet^s, *endA1*, *thi-1*, Δ (*hsdS-mcrB*)5

E. coli NEBTurbo Zellen sind wie *E. coli* NEB5 α -Zellen T1-phagenresistent. Diese Resistenz ist mit einem langsameren Zellwachstum verbunden. Dieser Nachteil wird bei *E. coli* NEBTurbo Zellen kompensiert, wodurch sie innerhalb von 8 h bei Inkubation bei 37°C sichtbare Kolonien bilden können.

Expressionsstämme

***E. coli* BL21(DE3)** (Studier & Moffatt, 1986)

B F⁻ *ompT* *hsdS* (r_B⁻m_B⁻) *dcm*⁺ *gal* λ (DE3)

Diese Zellen tragen auf ihrem Chromosom das Gen für die T7 RNA-Polymerase, die zur Genexpression im pET-System verwendet wird.

***E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)** (STRATAGENE, La Jolla, USA)

B⁻ F⁻ *ompT hsdS* (*r_B⁻m_B⁻*) *dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte*

- RP-Stamm: [*argU proL Cam^r*]

- RIL-Stamm: [*argU ileY leuW Cam^r*]

- RIPL-Stamm: [*argU proL Cam^r*] [*argU ileY leuW Strep/Spec^r*]

BL21 CodonPlus (DE3) RP Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU* und *proL*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone AGA und AGG für Arginin und CCC für Prolin enthalten. BL21 CodonPlus (DE3) RIL Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU*, *ileY* und *leuW*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone AGA und AGG für Arginin, AUA für Isoleucin und CUA für Leucin enthalten. BL21 CodonPlus (DE3) RIPL Zellen enthalten auf einem pACYC-basierten Plasmid Gene für die tRNAs *argU* und *proL* sowie auf dem pACYC-kompatiblen Plasmid pSC101 Gene für die tRNAs *argU*, *ileY* und *leuW*. Dieser Expressionsstamm erlaubt dadurch die effiziente Expression von Genen, die die in *E. coli* seltenen Codone, welche für die RP- und RIL-Stämme bereits genannt wurden, enthalten. Das pACYC-Plasmid enthält zusätzlich das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase, die Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt. Das pSC101-Plasmid vermittelt zusätzlich Resistenz gegen Streptomycin und Spectinomycin.

***E. coli* T7 Express** (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt am Main)

fhuA2 lacZ::T7gene1 lon ompT gal sulA11 dcm R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2

Bei diesen Zellen handelt es sich um ein *E. coli* BL21(DE3) Derivat. Durch die Deletion des Gens *fhuA2* fehlt der Eisen-Hydroxamat-Aufnahme-Rezeptor, wodurch diese Zellen resistent gegen den Bacteriophage T1 sind. Zusätzlich enthalten die Zellen eine Tetrazyklinresistenz.

***E. coli* T7 Express Rosetta** (Lehrstuhl Sterner)

fhuA2 lacZ::T7gene1 lon ompT gal sulA11 dcm R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [*argU argW glyT ileX, leuW metT proL thrT thrU tyrU Cam^r*]

Diese Expressionszellen wurden am Lehrstuhl Biochemie II hergestellt. Es handelt sich um *E. coli* T7 Express Zellen, die zusätzlich das pRARE Plasmid aus *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS NOVAGEN, Darmstadt) enthalten, wodurch die Expression von Genen mit in *E. coli* seltenen Codonen (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) in einem T1-phagenresistenten *E.*

coli Stamm ermöglicht wird. Neben der Tetrazyklinresistenz erhalten die Zellen durch das pRARE-Plasmid zusätzlich eine Chloramphenicolresistenz.

***S. solfataricus* PH1-16** (Martusewitsch et al., 2000)

pyrF:ISC1359, *lacS*:ISC1217

Dieser Stamm ist Uracil auxotroph und kann Galactose nicht verstoffwechseln. Die Ursache hierfür sind *insertion sequence* (IS) Elemente, die sowohl im *pyrEF* Gencluster als auch im β -Galactosidase Gen *lacS* integriert sind. Dieser Stamm kann mit dem Virusvektor pMJ05 (Albers et al., 2006a) transformiert werden, welcher den Selektionsmarker *pyrEF* und ein zu exprimierendes Gen unter Kontrolle eines Arabinose-abhängigen Promoters trägt (siehe 2.2.2).

***S. solfataricus* PBL2025** (Schelert et al., 2004)

$\Delta lacS$

Dieser Stamm kann aufgrund einer spontanen Deletion von *lacS* keine Lactose verstoffwechseln. Die Deletion umfasst die offenen Leserahmen SSO3004 bis SSO3050. Der Stamm wurde bei den Interaktionsstudien von sTrpB2i in Zellextrakten verwendet.

Ausgangsstamm für die Erstellung von Deletionsmutanten in *T. kodakaraensis*

***T. kodakaraensis* KOD1 KU216** (Sato et al., 2005)

$\Delta pyrF$

Dieser Stamm ist Uracil auxotroph, da das *pyrF* Gen durch homologe Rekombination vollständig disruptiert wurde. Er kann als Ausgangsstamm für *knockout* Experimente verwendet werden. Dabei wird das zu disruptierende Gen mittels homologer Rekombination durch *pyrF* ersetzt, wobei auf Uracil-Prototrophie selektiert werden kann.

2.2 Vektoren

2.2.1 pET-Vektoren für die Expression von Proteinen in *E. coli*

Gene, die in die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pET-Vektoren (NOVAGEN, *plasmid for expression by T7 RNA Polymerase*) eingefügt wurden, werden durch die RNA-Polymerase des Phagen T7 (Studier et al., 1990) transkribiert. Die Expression der Gene erfolgt in speziellen *E. coli* Stämmen, die eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase besitzen. Die Expression des T7 RNA-Polymerasegens sowie des in die MCS inserierten Gens erfolgt unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotor-Operators und wird durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Das zur Unterdrückung der Expression

erforderliche Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*) liegt auf dem Plasmid und wird konstitutiv exprimiert.

pET21a(+) & pET24a(+)

Die pET21a(+)- und pET24a(+)-Vektoren sind so konstruiert, dass unmittelbar stromabwärts der MCS sechs Histidin-Codone liegen. Das hergestellte Protein trägt dadurch C-terminal einen (His)₆-Tag, der eine Aufreinigung durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie ermöglicht.

Nach Transformationen mit dem pET21a(+)-Vektor kann mittels der enthaltenen Ampicillin-Resistenz (*bla*) auf *E. coli* Zellen selektiert werden, die das Plasmid aufgenommen haben. Im Falle von pET24a(+)-Vektoren erfolgt die Selektion über eine Kanamycin-Resistenz (*kan*). Beide Vektoren sind mit Ausnahme der ausgebildeten Resistenz identisch.

pET28a(+)

Im Vektor pET28a(+) befinden sich stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle Codone für einen (His)₆-tag gefolgt von einer Thrombin-Schnittstelle. Um den (His)₆-tag nutzen zu können wurde das jeweilige Gen 5'-seitig über eine *NdeI* Schnittstelle in den entsprechenden Leserahmen kloniert. Das Plasmid beinhaltet als Selektionsmarker das Kanamycin-Resistenzgen.

2.2.2 Vektoren für die Expression von Proteinen in *S. solfataricus*

pMZ1 (Zolghadr et al., 2007) (Abbildung 13)

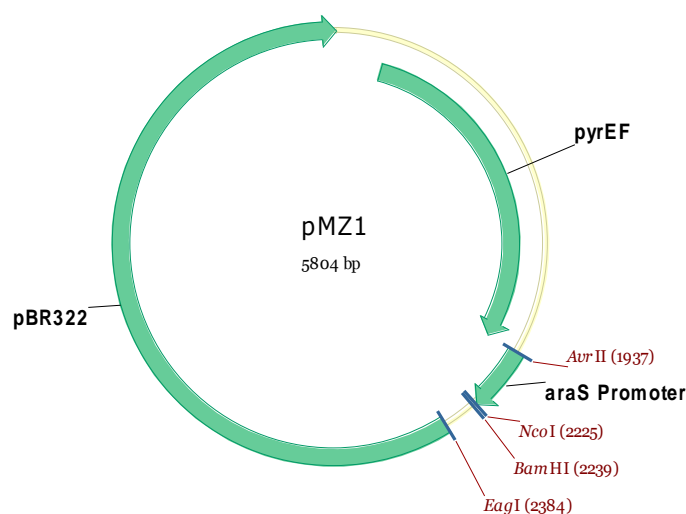


Abbildung 13: pMZ1, Zwischenklonierungsvektor für die Expression in *S. solfataricus*.

Dieser Vektor basiert auf pBR322 und dient zur Zwischenklonierung in *E. coli* von in *S. solfataricus* zu exprimierenden Genen. Dabei wird das Gen über die Schnittstellen *NcoI* und

*Bam*HI stromabwärts des Arabinose-abhängigen Promoters *araS* kloniert. Über die Schnittstellen *Avr*II und *Eag*I wird das Gen gemeinsam mit dem Promoter in den eigentlichen Virusvektor pMJ05 umklontiert.

pMJ05 (Albers et al., 2006b) (Abbildung 14)

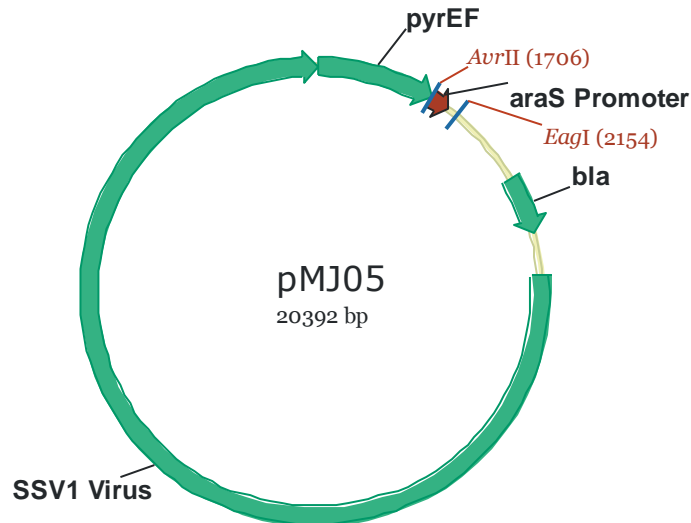


Abbildung 14: pMJ05 Virus-Shuttlevektor für die Proteinexpression in *S. solfataricus*.

Dieser Vektor ist der Virus-Shuttlevektor, mit dem der Uracil auxotrophe *S. solfataricus* Stamm PH1-16 transformiert wird. Die Expressionskassette, bestehend aus dem *araS* Promoter und dem zu exprimierenden Gen, wird über die Schnittstellen *Avr*II und *Eag*I aus pMZ1 eingefügt. Die Klonierung erfolgt dabei in *E. coli* ElectroMAX Stbl4 Zellen unter Ausnutzung des Vektor-codierten Ampicillin Resistenzgens β -Lactamase (*bla*). Daneben enthält der Vektor den Virus SSV1, welcher dazu dient, das Plasmid in das Genom von *S. solfataricus* zu integrieren. Die Selektion auf stabile Integration in *S. solfataricus* erfolgt über die *pyr*EF Kassette, die Uracil Prototrophie vermittelt.

2.2.3 Der pJET 1.2 Vektor zur Erstellung von Deletionsstämmen in *T. kodakaraensis*

Der Vektor pJET1.2 ist Bestandteil des CloneJET PCR Cloning Kit der Firma MBI FERMENTAS (St. Leon-Rot) (Abbildung 15).

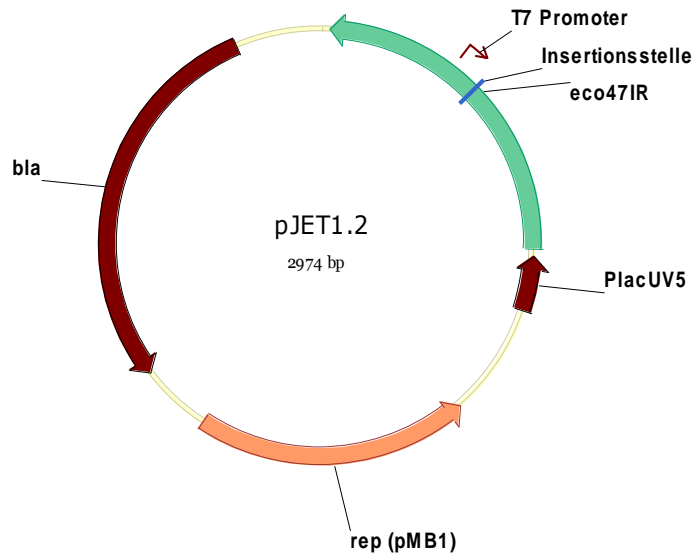


Abbildung 15: pJET1.2, Vektor für die *blunt end* Klonierung von PCR Produkten.

An der Insertionsstelle liegt ein *blunt end* Schnitt vor, in den beliebige PCR Produkte kloniert werden können, ohne dass ein Verdau über Restriktionsenzyme nötig wäre. Religation von Vektoren ohne Insert wird zuverlässig dadurch verhindert, dass das Genprodukt von *eco47IR* letal für die Zellen ist. Daneben liegt eine Ampicillin Resistenzkassette und ein T7 Promoter für *in vitro* Transkriptionsexperimente vor. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor für die Erstellung von Konstrukten für die homologe Rekombination in *T. kodakaraensis* verwendet.

2.3 Oligodesoxyribonukleotide

Bei endständigen Amplifikationsprimern sind die genannten Restriktionsschnittstellen unterstrichen. Bei Mutationsprimern sind diejenigen Basen, die von der Originalsequenz abweichen, fett gedruckt. Wurden Primer von Dritten zur Verfügung gestellt, erfolgt die Angabe der Person bzw. des Herstellers in Klammern.

2.3.1 Vektorspezifische Amplifikations- und Sequenzierungsprimer

5'T7 Promotor

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'

3'T7 Terminator

5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'

SP/pMJ0503 sTrpA/1332-3172

5'- GCG AAA TTC ATA CGT AGA GAC TC -3'

ASP/pMJ0503 sTrpA/1332-3172

5'- AAT ACG CAA ACC GCC TCT -3'

pJET1.2 forward sequencing primer (Fermentas, St. Leon-Rot)

5'- CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC -3'

pJET1.2 reverse sequencing primer (Fermentas, St. Leon-Rot)

5'- AAG AAC ATC GAT TT TCC ATG GCA G -3'

SP/pMZ1/upstream_avr2

5'- GGA TGC TAA ACA ACT ATT CAA ACT GT -3'

ASP/pMZ1/downstream_eag1

5'- AGA AGA ATC ATA ATG GGG AAG GC -3'

2.3.2 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für *trpA* Gene

5'ssTrpA_W65 (Sonja Leopoldseder)

5'- CTA GAT ATT **TTT** CCC TTA ATA -3'

3'ssTrpA_W65 (Sonja Leopoldseder)

5'- TAT TAA GGG **AAA** AAT ATC TAG -3'

5'ssTrpA_W88 (Sonja Leopoldseder)

5'- TTA GAA GAT **TTT** GTT GAT CAG -3'

3'ssTrpA_W88 (Sonja Leopoldseder)

5'- CTG ATC AAC **AAA** ATC TTC TAA -3'

5'sTrpA S206C

5'- AGA GAT GCT CTA **TGT** GCT GGT GCT GA -3'

5' sTrpA S229C

5'- GGA ATG GTG TAA AAT **GTG** CAA TAA ATT TAG TT -3'

2.3.3 Amplifikations- und Mutagenisierungsprimer für *trpB* Gene

ssTrpB2aQCMg81a_F

5'- CTC CAC CAA GAG ATC CAC AAG GTG CCT ATTT CTC GAG -3'

ssTrpB2aQCMg81_R

5'- CTT GTG GAT CTC TTG GTG GAG GCA AGG GTT TAG GTA AGA TC-3'

ssTrpB2aNcoI_F

5'- CGG CGC GCC CAT GGT AAA AGA AGA CGA GAT TTT GCC TAA ATA TTG
GTA C -3'

3'sTrpB2i_6xHis_BamHI

5'- TGA TGG ATC CTT AAT GGT GAT GGT GAT GGT GCC CAT TTC CAT TCA
ACC TTT TCA -3'

2.3.4 Primer zur Herstellung der *T. kodakaraensis* Deletionsstämme $\Delta trpB2$, $\Delta trpB1$ und $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$

SP/TKo/1265332-1266331

5'- GCG GAA ATA GGA AAG GCC C -3'

ASP/TKO1265332-1266331/PyrF

5'- ACA CCC CCT CAG GAC TCT AGT CAT CTA ACT GGC GGA CCT TG -3'

SP/PyrF/tKo/1267133-1268132

5'- AA TGC GCG TTG CGG ACT AGA TTC TTG GTC TCA ATG TAA GGG TG -3'

ASP/TKo/1267133-1268132

5'- TTC AAG TAC GTG GTA ACG GGC -3'

SP/TKO1266311-1266331/PyrF

5'- CAA GGT CCG CCA GTT AGA TGA CTA GAG TCC TGAG GGG GTG T -3'

Asp/PyrF/TKO1267133-1267155

5'- CAC CCT TAC ATT GAG ACC AAG AAT CTA GTC CGC AAC GCG CAT T -3'

SP/T.ko PyrF

5'- CTA GAG TCC TGA GGG GGT GT -3'

ASP/T.ko PyrF

5'- TAG TCC GCA ACG CGC AT -3'

SP/KO verifizierung/upstream Genom

5'- GAG TTG GAT GGG AAC CCA -3'

ASP/KO verifizierung/upstream Genom

5'- CTG ACT ACG TGA TAG TCG GGG -3'

SP/KO verifizierung/downstream Genom

5'- CGC TCG AGA TTA AAT TAA CCC -3'

ASP/KO verifizierung/downstream Genom

5'- CTG TCT TTG TCA AGC TTG AAG A -3'

SP/KOD1 genom/1266381-1267096

5'- CCA ATA CGC GAG CAA AAG -3'

ASP/KOD1 genom/1266381-1267096

5'- CCT GCT CCA GTC TCG GTT A -3'

SP/TKO/214429-215429

5'- CCG GAG ATA GTC CTC GAG G -3'

ASP/TKo/214429-215429/rPyrF

5'- AAT GCG CGT TGC GGA CTA GAT CCT CAC CAC CGC CAT G -3'

SP/TKo/214429-215429/rPyrF

5'- CAT GGC GGT GGT GAG GAT CTA GTC CGC AAC GCG CAT T -3'

ASP/Tko/216230-217230/rPyrF

5'- GAG CTC GCC GGC GTT CAG CCT AGA GTC CTG AGG GGG TGT -3'

SP/Tko/216230-217230/rPyrF

5'- ACA CCC CCT CAG GAC TCT AGG CTG AAC GCC GGC GAG CTC -3'

ASP/TKO/216230-217230

5'- CGT CGG CTC CAG CCT TCA -3'

SP/tkGenom/214216-217494

5'- AGC AGT TCT GAA GGC GCT -3'

ASP/tkGenom/214216-217494

5'- CAC GAT TCT CCC GAT TTC A -3'

SP/tkGenom/215432-216031

5'- GGA TGA TAT GTT CTT CGG AAG G -3'

ASP/tkGenom/215432-216031

5'- TGG AAG TCC CTC ACG ATG A -3'

SP/Kompl tkTrpB1/P1

5'- AAT CCC TGC CGA TAT CCG -3'

SP/Kompl tkTrpB1/P2

5'- TTG GAT GAA GGG GCT TGA CCG CAA CGC GCA TTT TGC TCA -3'

ASP/Kompl tkTrpB1/P3

5'- TGA GCA AAA TGC GCG TTG CGG TCA AGC CCC TTC ATC CAA -3'

SP/Kompl tkTrpB1/P4

5'- GGG CCG TTA AAA AGG TGA TGC ATA TGG ATG ATA

TGT TCT TCG GAA GG -3'

ASP/Kompl tkTrpB1/P5

5'- CCT TCC GAA GAA CAT ATC ATC CAT ATG CAT CAC CTT

TTT AAC GGC CC -3'

SP/Kompl tkTrpB1/P6

5'- AGG GTC GGG AAT GTT TGA AGA GCA GCC CTT GCC TCG CAA -3'

ASP/Kompl tkTrpB1/P7

5'- TTG CGA GGC AAG GGC TGC TCT TCA AAC ATT CCC GAC CCT -3'

ASP/Kompl tkTrpB1/P8

5'- TCA CAG CCT CCT GAA GTT CTC C -3'

ASP/Kompl tkTrpB1/P9

5'- TAT CTT CGC CCC TCC CAG CT -3'

SP/Kompl tkTrpB1/P10

5'- CCT TCC ACG AGC TTT CCA -3'

SP/Kompl tkTrpB1/P11

5'- TGT ACG TTG AGG TCC CGA G -3'

ASP/Kompl tkTrpB1/P12

5'- GAG CTC CGA AAA GCC CTG -3'

SP/Kompl tkTrpB1/P13

5'- TCA GGA GAA GGG GCC TTG A -3'

ASP/Kompl tkTrpB1/P14

5'- ATC TCA GCC AGC CTC ATC C -3'

2.4 LängenstandardsDNA-Längenstandards**Smart Ladder** (EUROGENTEC)

Polynukleotidgrößen [bp]: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200

GeneRuler 1 kb Plus (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot)

Polynukleotidgrößen [bp]: 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75

Proteinlängenstandards**Unstained Protein Molecular Weight Marker** (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot)

Molare Massen [kDa]: 116,0 (β -Galaktosidase), 66,2 (Albumin), 45,0 (Ovalbumin), 35,0 (Laktat Dehydrogenase), 25,0 (Restriktionsenzym Bsp98I), 18,4 (β -Laktoglobulin), 14,4 (Lysozym)

PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot)

Molare Massen [kDa] 170, 130, 100, 70 (rot markiert), 55, 40, 35, 25, 15, 10 (grün markiert)

2.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
GoTaq DNA-Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
Pwo DNA-Polymerase	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.
T4-DNA-Ligase	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Thrombin from bovine plasma	SIGMA-ALDRICH, Steinheim

2.6 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

AMERSHAM PHARMACIA Biotech	Freiburg
APPLICHEM GmbH	Darmstadt
BIO101 Inc.	Carlsbad, USA
BIORAD LABORATORIES	München
BIOZYM	Hess. Oldendorf
BODE CHEMIE	Hamburg
BOEHRINGER MANNHEIM	Mannheim
CARL ROTH GMBH & Co. KG	Karlsruhe
DIFCO	Dreieich
FLUKA	Neu-Ulm
GERBU Biotechnik GmbH	Gailberg
GIBCO/BRL	Eggestein
MERCK	Darmstadt
MP BIOCHEMICALS	Illkirch, Frankreich
NATIONAL DIAGNOSTICS	Simerville, NJ, USA
OXOID	Wesel
RIEDEL-DE HAEN	Seelze
ROCHE DIAGNOSTICS	Mannheim
SERVA	Heidelberg
SIGMA-ALDRICH	Deisenhofen
VWR	Leuven, Belgien

Indol-3-Glycerinphosphat (IGP): wurde nach der Vorschrift bei Bolz (2006) synthetisiert, gereinigt und analysiert.

2.7 Antikörper

Anti-His ₆ , Peroxidase-konjugiert	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG	PIERCE, THERMO FISHER
Meerrettich-Peroxidase Konjugat (31460)	SCIENTIFIC, Bonn

Anti-tmTrpB1 (gegen das Peptid GEEDTIRQKPNVERMK) und anti-tmTrpB2o (gegen das Peptid LDPPLDPETKQPISPEK) Antikörper aus Kaninchen wurden von der Firma Biogenes (Berlin) wie bei Leopoldseder (2005) beschrieben, hergestellt.

Anti-sTrpB2i (gegen das Peptid CLLDLSNYESMMKRLNGNG) und anti-sTrpB2a (gegen das Peptid MAMRIRIDLQPQEIPAQWY) Antikörper aus Kaninchen wurden von der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) hergestellt.

2.8 Kits

GeneJETPlasmid Miniprep Kit	MBI FERMENTAS, St.-Leon-Rot
Nucleobond PC100/500 <i>DNA-Extraction</i> Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
Nucleospin Extract II	MACHEREY-NAGEL, Düren
QIAprep spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEX II Gelextraktions Kit	QIAGEN, Hilden
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	THERMO SCIENTIFIC, Bonn

2.9 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch: Visking, Typ 27/32, 14 kDa	ROTH GmbH +Co, Karlsruhe
Einwegspritzen Omnifix 2 ml, 5 ml und 60 ml	BRAUN Biotech, Melsungen
Elektroporationsküvetten 2 mm	PEQLAB, Erlangen
Faltenfilter	MACHEREY-NAGEL, Düren
Konzentratoren:	
Amicon Ultra 4 bzw. 15 (mwco: 10 kDa)	MILLIPORE, Eschborn
Kunststoffküvetten: ½ Mikroküvetten	SARSTEDT, Nümbrecht
Kunststoffröhrchen:	
15 ml, 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Falcon 15 ml bzw. 50 ml	BECTON DICKINSON, Franklin Lakes, USA
Latex-Handschuhe Sempermed	SEMPERIT, Wien, Österreich
Membranfilter ME24 Ø47 mm; 0,2 µm	SCHLEICHER&SCHUELL, Dassel
Nitrocellulosefilter (Ø13 mm; Cat#: VSWP01300)	MILLIPORE, Eschborn
NAP5, NAP10 und NAP25 Säulen	GE HEALTHCARE, München
Nitril Untersuchungshandschuhe	VWR, Leuven, Belgien
Parafilm „M“ Laboratory Film	PECHINEY, Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	HIRSCHMANN, Ebermannstadt
PCR-Gefäße 0,2 ml	PEQLAB, Erlangen
Petrischalen 150/25 und 94/16	GREINER bio-one, Nürtingen

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	ROTH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Spritzenfilter Porengröße 0,2 µm	RENNER GmbH, Daunstadt
Spritzenfilter Nylon 0,22 µm A0641	ROTH, Karlsruhe
Filterpapier 3 MM	WHATMAN, Maidstone, GB

2.10 Geräte

Autoklaven

München 25

MMM, München

VE-40

SYSTEC GmbH, Wettenberg

Brutschränke

BINDER GmbH, Tuttlingen

Chromatografieanlagen:

1200 HPLC System

AGILENT, Böblingen

ÄKTA basic better

GE HEALTHCARE, München

ÄKTA purifier 10

GE HEALTHCARE, München

verwendete Säulen:

Gemini-NX 3 µm C18 110A 150x3 mm

PHENOMENEX, Aschaffenburg

HisTrap FF Crude 5 ml

GE HEALTHCARE, München

Jupiter 5 µm C5 300A 250x2 mm

PHENOMENEX, Aschaffenburg

Luna 3 µm C18(2) 100 A 150x3 mm

PHENOMENEX, Aschaffenburg

Luna 5 µm C18(2) 100 A 250x10 mm

PHENOMENEX, Aschaffenburg

MonoQ HR 16/10

GE HEALTHCARE, München

MonoQ 5/50 GL

GE HEALTHCARE, München

Superdex 75 HR 10/300 GL

GE HEALTHCARE, München

Superose 12 10/300 GL

GE HEALTHCARE, München

TSK GEL 3000 SW

LKB, Bromma, Schweden

Cell Density Meter Ultrospec 10

GE HEALTHCARE, München

Computer

Dell Optiplex Systems

Elektroporator 2510

EPPENDORF, HAMBURG

Fluoreszenz-Spektrometer Cary Eclipse

VARIAN, Darmstadt

Gasbrenner Gasprofi 2SCS

WLD Tec GmbH, Göttingen

Gefrierschrank -80 °C

MDF-U72V, SANYO, Tokyo, Japan

Gefrierschrank -20 °C

LIEBHERR, Nussbaumen

Gefriertrockungsanlage Lyovac GT2

LEYBOLD-HERAEUS, Hürth

Gelelektrophoresekammern:

Agarose-Elektrophorese-Apparatur

HOEFER Pharmacia Biotech, USA

SDS-Elektrophoresekammer

Mighty Small II

HOEFER Pharmacia Biotech, USA

Multi Gel Caster Gelgießstand

GE HEALTHCARE, München

Glaspipetten & Glaswaren

SCHOTT, Mainz

FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte

NOVOGLAS, Bern, Schweiz

Hamilton Mikroliterspritze, 25 µl

HAMILTON, Birsfelden, Schweiz

Heizblock-Thermostat HBT-2 131

HLC, Bovenden

Inkubationsschüttler:

GFL 3033

GFL, Burgwedel

Certomat H

BRAUN Biotech, Melsungen

Certomat BS-1

BRAUN Biotech, Melsungen

Magnetrührer:

MR0, MR2000

HEIDOLPH, Kehlheim

MR1, MR3001 (beheizbar)

HEIDOLPH, Kehlheim

Microliterpipetten: Research 2, 10, 100, 1000

EPPENDORF, Hamburg

Mikrowelle HMT 842C

BOSCH, Nürnberg

Multi-Doc-It Digital Imaging System

UVP Inc., USA

Netzgeräte:

Power Supply EPS 301

GE HEALTHCARE, München

Power Pack P25

BIOMETRA, Göttingen

PCR-Geräte:

Mastercycler personal

EPPENDORF, Hamburg

Mastercycler gradients

EPPENDORF, Hamburg

Peristaltikpumpe Miniplus 2

GILSON Medical Electronics, Frankreich

pH-Meter inolab Level1

INOLAB, Weilheim

Pipettus-accu

HIRSCHMANN, Laborgeräte, Eberstadt

Quarzküvetten:

101-QS (Schichtdicke 10 mm)

HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim

105-QS (Schichtdicke 10 mm)

HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim

110-QS (Schichtdicke 1 mm)

HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim

Rotationsverdampfer Laborota 4000

HEIDOLPH, Schwabach

Schütteltisch Rocking Platform

BIOMETRA, Göttingen

Thoma-Zählkammer

ROTH, Karlsruhe

Ultraschallgerät Branson Sonifier 250D

HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd

UV-Leuchttisch Reprostar	CAMAG Chemie Erzeugnisse, Berlin
UV-Vis Spektralphotometer Cary 100 Bio	VARIAN, Darmstadt
UV-Vis Spektralphotometer V650	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
UV-Vis Biophotometer	EPPENDORF, Hamburg
Vakuumpumpe ME 2C	VACUUMBRAND, Wertheim
Vortex Genie 2	SCIENTIFIC IND., Bohemia, USA
Waagen:	
MC1	SARTORIUS, Göttingen
SI-114	DENVER INSTRUMENT, Göttingen
Wasserbad 1003	GFL, Burgwedel
Westernblot Apparatur 52-WEB-10	PEQLAB, Erlangen
Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage	MILLIPORE, Eschborn
Zentrifugen:	
Centrifuge 5810R	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415D	EPPENDORF, Hamburg
Centrifuge 5415R	EPPENDORF, Hamburg
Sorvall RC 2B, 5C plus	DU PONT Instruments, Bad Homburg
mit SS34- bzw. GS3-Rotoren	

2.11 Nährmedien für *E. coli*

Zur Sterilisation wurden die Medien für 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Bei Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika nachträglich, nach Abkühlen der Medien auf ca. 60°C, in Form von sterilfiltrierten, 1000-fach konzentrierten Stammlösungen zugegeben.

Luria-Bertani-(LB)-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, 1,0 % (w/v) Trypton

LB-Agar

LB-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 2,0 % (w/v) Trypton

nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl (jeweils steril filtriert) hinzugefügt.

SOC-Medium

SOB-Medium plus 20 mM Glucose (steril filtriert) nach dem Autoklavieren.

SOC-Agar

SOC-Medium plus 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

2.12 Nährmedium für *S. solfataricus*

Brock I: (1000x)	CaCl ₂ x 2H ₂ O 70g/l ,autoklaviert
Brock II: (100x)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 130g/l, autoklaviert MgSO ₄ x 7H ₂ O 25g/l 1.5 ml H ₂ SO ₄ 1:1
Brock III (200x)	KH ₂ PO ₄ 56g/l, autoklaviert Spurenelemente (1000x) siehe Liste 1.5 ml H ₂ SO ₄ 1:1
Eisenlösung (100x)	FeCl ₂ oder FeCl ₃ x6H ₂ O 2g/l, sterilfiltriert
Spurenelemente (1000x)	10 nM MnCl ₂ , sterilfiltriert 120 nM Na ₂ B ₄ O ₇ 640 nM ZnSO ₄ 0.5 nM CuCl ₂ 0.1 nM NaMoO ₄ 0.1 nM VOSO ₄ 0.03 nM CoSO ₄ 0.09 nM NiSO ₄

Für 1l Brock Medium nach Grogan (1989)

1ml Brock I
10 ml Brock II
5 ml Brock
10 ml Eisenlösung
ddH₂O ad 1 l
pH auf 3,0 bis 3.5 mit 50 % (^w/_v)H₂SO₄

Mögliche organische Zusätze:

Trypton	0.1% (^w / _v)
Hefeextrakt	0.1%
Saccharose	0.2%
NZ-Amin	0,1%
verschiedene Zucker	0.4%

2.13 Nährmedien für *T. kodakaraensis*

Synthetisches Meerwasser, SME- Medium :

Substanz	Menge	Konzentration
NaCl	27,7 g	473,99 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,0 g	28,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,5 g	27,1 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,75 g	5,1 mM
KCl	0,65 g	8,7 mM
NaBr	0,1 g	0,97 mM
H ₃ BO ₃	0,03 g	0,49 mM

SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,015 g	0,056 mM
KJ-Lsg., 0,05%ig	0,1 ml	0,30 µM
ddH ₂ O	ad 1 l	

Mineralienelexier 10x/pH 6,5/neu+Titriplex nach Wolfe (Wolin et al., 1963)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
Titriplex 1 (Nitrilotriacetic acid)	15,0 g	78,5 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,0 g	121,70 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	5,0 g	29,60 mM
NaCl	10,0 g	171,10 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g	3,60 mM
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	1,8 g	6,40 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,0 g	6,80 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,8 g	6,30 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,1 g	0,40 mM
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,18 g	0,38 mM
H ₃ BO ₃	0,1 g	1,63 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g	0,41 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2,80 g	7,09 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,1 g	0,30 mM
Na ₂ SeO ₄	0,1 g	0,53 mM
ddH ₂ O	ad 1 l	
pH 6,5		

Vitamine nach Wolfe (10x) (Wolin et al., 1963)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxamindihydrochlorid (B6)	100 mg
Thiamindihydrochlorid (B1)	50 mg
Riboflavin	50 mg
Nikotinsäure	50 mg
DL-Calciumpantothenat	50 mg
Cyanocobalamin (B12)	1 mg
p-Aminobenzoessäure	50 mg
Liponsäure	50 mg
ddH ₂ O	ad 1 l

Steril filtrieren (Porengröße: 0,2 µm) und bei 4-6°C dunkel lagern

Aminosäure-Stammlösung (1x) (Sato et al., 2005)

<i>Aminosäure</i>	<i>Menge pro Liter</i>	<i>Lösungsmittel</i>
Alanin	75 mg	H ₂ O
Arginin	125 mg	H ₂ O
Asparagin	100 mg	1 N HCl
Aspartat	50 mg	1 N HCl
Cystein	250 mg	1 N NaOH
Glutamat	200 mg	1 N NaOH
Glutamin	200 mg	H ₂ O
Glycin	200 mg	H ₂ O

Histidin	200 mg	1 N HCl
Isoleucin	100 mg	H ₂ O
Leucin	100 mg	H ₂ O
Lysin	100 mg	1 N NaOH
Methionin	75 mg	1 N NaOH
Phenylalanin	75 mg	1 N NaOH
Prolin	12 5mg	H ₂ O
Serin	75 mg	H ₂ O
Tryptophan	75 mg	1 N NaOH
Tyrosin	100 mg	1 N NaOH
Valin	50 mg	H ₂ O

Für eine 20x Stammlösung die 20-fache Menge der Aminosäuren zu geringem Volumen des jeweiligen Lösungsmittel zugeben. Die 3 Lösungen werden nach Begasung mit N₂ in der Anaerobenkammer steril in eine gemeinsame, autoklavierte Schottflasche filtriert. Das Volumen in der Schottflasche wird zuletzt mit sterilem Wasser auf 1 l aufgefüllt und die Stammlösung bei 4-6 °C im Dunkeln gelagert.

Für Fermentationen im 100 l Maßstab wurden so große Mengen der Aminosäurestammlösung benötigt, dass eine Sterilfiltration in der Anaerobenkammer technisch nicht mehr möglich war. Deshalb wurden 10 l der Aminosäurestammlösung und 1 l der Uracilstammlösung (1 g/l in wenig 1N NaOH lösen, dann mit Wasser auf 1 l auffüllen und pH auf 7 einstellen) außerhalb der Anaerobenkammer heiß über eine Millipore Sterivac GP-10 Filtrationseinheit sterilisiert. Anschließend wurden die leicht geöffneten Flaschen in der Druckschleuse der Anaerobenkammer 10 min einem Vakuum ausgesetzt, anschließend 10 min dem Kammergas. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt, dann wurden die Flaschen über Nacht in der Kammer gelagert, um am nächsten Tag für den Fermenter verwendet werden zu können.

Minimalmedium (½ SME-Medium-AA)

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
NH ₄ Cl	0,25 g
SME	500 ml
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Wolfe's Mineralien (10x/pH 6,5/neu+T)	1,0 ml
Wolfe's Vitamine (10x)	1,0 ml
Resazurin, 0,1 %ig	1,0 ml
Na ₂ Sx7-9 H ₂ O	0,5 g
Schwefel	2,0 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Der Schwefel wird vor Zugabe geturaxt. Das Natriumsulfid wird nach Begasung mit N₂ zugegeben. Anschließend wird der pH anaerob auf 7,0 eingestellt. Nach Abfüllen in 100 bzw. 1000 ml Serumflaschen zu je 20 bzw. 400 ml im Anaerobenzelt wird das Medium mit N₂

begast (1 bar Überdruck bei 20 ml, 0,5 bar bei 400 ml) und durch Autoklavieren (1 h, 110 °C) sterilisiert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wird je 1 ml 20x Aminosäure-Stammlösung (mit oder ohne Tryptophan) zu 20 ml Medium gegeben. Zur Selektion wurden entsprechend 5 µg/ml Uracil, 75 µg/ml Tryptophan oder 0,75% FOA (Stammlösung 10% FOA in DMSO, dunkel lagern) zugegeben.

½ SME-AA Gelrite Platten :

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
NH ₄ Cl	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Gelrite	15, 0g
Wolfe`s Mineralien (10x/pH6,5/neu+T)	1,0 ml
Wolfe`s Vitamine (10x)	1,0 ml
Polysulfidlösung	2,0 ml
SME	500,0 ml
ddH ₂ O, pH 7,0	ad 950,0 ml

Medium sterilisieren (1h, 110°C). 50ml Aminosäure-Stammlösung (20 x; mit oder ohne Tryptophan und Uracil) in der Anaerobenkammer auf ca. 80°C vorwärmen. Medium bei etwa 95°C aus dem Autoklaven nehmen, entgasen und in die Anaerobenkammer einschleusen. Vorgewärmten AS-Mix zum Medium geben, mischen und Platten dick gießen.

Basis für Vollmedium: ½ SME-Medium

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
SME	500 ml
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Wolfe`s Mineralien (10x/pH6,5/neu+T)	1,0 ml
Resazurin, 0,1%ig	1,0 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,5 g
ddH ₂ O,	ad 1 l

Vollmedium ½ SME-Medium mit Hefeextrakt, Stärke und Pepton

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Stärke	1 g
Hefeextrakt	1 g
Pepton	1 g
½ SME Medium, pH 7,0	ad 1 l

Die Stärke wird vor Zugabe durch Kochen in Wasser gelöst. Das Natriumsulfid wird nach Begasung mit N_2 zugegeben. Anschließend wird der pH anaerob auf 7,0 eingestellt. Nach Abfüllen in Serumflaschen zu je 20 ml im Anaerobenzelt wird das Medium mit N_2 begast und durch Autoklavieren (20 min, 123 °C) sterilisiert.

2.14 Nährmedium für *T. maritima*

MM-I Medium

Substanz	Menge
SME (siehe Kapitel 2.13)	250 ml
KH_2PO_4	0,5 g
$NaHCO_3$	0,1 g
Wolfe's Mineralien/10x/pH6,5/+T (siehe Kapitel 2.13)	1,5 ml
Resazurin, 0,1%ig	1,0 ml

Das Medium wird mit 5 g aufgekochter Stärke und 0,5 g Hefeextrakt versetzt und mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt. Nach Begasung mit N_2 werden 0,5 g $Na_2S \cdot 9 H_2O$ (gelöst in 500 µl Wasser) zugesetzt und der pH anaerob auf 7 eingestellt. Nach Begasung mit N_2/CO_2 wird das Medium anaerob abgefüllt (20 ml in 50 ml Serumflaschen oder 400 ml in 1 l Serumflaschen) und mit N_2 (1 bar bei 20 ml bzw. 0,5 bar bei 400 ml Medium) begast. Anschließend wird es durch Autoklavieren (20 min, 123°C) sterilisiert.

2.15 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Puffer steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde MILLIPORE bzw. bidestilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.15.1 Arbeiten mit *E. coli*

Antibiotika

Die langfristige Lagerung der gelösten Antibiotika erfolgte nach Sterilfiltrierung bei -20 °C, die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Ampicillin-Stammlösung (1000x)

150 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser gelöst und steril filtriert.

Chloramphenicol-Stammlösung (1000x)

30 mg/ml Chloramphenicol in 100 % EtOH gelöst und steril filtriert.

Kanamycin-Stammlösung (1000x)

75 mg/ml Kanamycin in Wasser gelöst und steril filtriert.

Tetracyclin-Stammlösung (1000x)

12,5 mg/ml Tetrazyklin in 100 % EtOH gelöst und steril filtriert.

CaCl₂

1 M CaCl₂ in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

Glucose

20 % (^w/_v) Glucose in Wasser gelöst, steril filtriert und bei RT gelagert.

IPTG-Stammlösung

0,5 M IPTG in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

TFBI-Puffer

100 mM KCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerol

Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert. Der Puffer (100 ml) wurde direkt vor der Verwendung frisch angesetzt.

TFBII-Puffer

100 mM Tris/HCl, pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerol

Die Stammlösungen der Einzelkomponenten wurden bei 4 °C gelagert.

2.15.2 Arbeiten mit *T. kodakaraensis*, *T. maritima* und *S. solfataricus***Aufschlusspuffer für die analytische Gelfiltration (*S. solfataricus*)**

10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 0,05% (^w/_v) Natriumazid, 5 mM DTT, ¹/₅₀ Complete Proteaseinhibitor Cocktail (ROCHE Diagnostics, Mannheim), ⁺/₁ 60 mM *rac* Glycerin-3-phosphat

Aufschlusspuffer für die analytische Gelfiltration (*T. maritima*)

50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 5 mM DTT, ¹/₅₀ Complete Proteaseinhibitor Cocktail (ROCHE Diagnostics, Mannheim)

Aufschlusspuffer für Anionentauscherchromatographie (*T. maritima*)

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM DTT, ¹/₅₀ Complete Proteaseinhibitor Cocktail (ROCHE Diagnostics, Mannheim)

Polysulfidlösung

10 g Na₂S, 3 g Schwefel, ad 15 ml ddH₂O, sterilfiltriert

TE Puffer

20 mM Tris/HCl pH 7,5
1mM EDTA

TEN-Puffer

20 mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 100 mM NaCl

TENST-Puffer

TEN-Puffer mit 1,6% (^w/_v) Natriumlauroylsarcosyl und 0,12% (^v/_v) Triton X-100

Transformationspuffer

40 mM Natriumpyruvat, 4,67 mM NH_4Cl , 80 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, $\frac{1}{2}$ SME (ohne KH_2PO_4) ad 1000 ml, pH 7,0

2.15.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose (1%)

5 g Agarose wurden in 500 ml 0,5 x TBE gelöst, aufgeköcht und bei 60 °C gelagert.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr)

Sucrose Farbmarker

60 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 0,5x TBE gelöst

TBE (5x)

445 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, 445 mM Tris (resultierender pH-Wert: 8,15)

2.15.4 Western Blot und Dot Blot Puffer

Transferpuffer für Westernblot und Dot Blot 2x

20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,02% (w/v) SDS

PBS 10x

91 mM Na_2PO_4 , 17 mM NaH_2PO_4 , 1,5 M NaCl, pH 7,4 mit NaOH eingestellt

PBS-T

1xPBS + 0,1% (v/v) Tween-20

Blockierungspuffer für Western-Blot und Dot-Blot

PBS-T mit 5% (w/v) Milchpulver

2.15.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)-Stammlösung (10%)

10 % (w/v) APS in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

Coomassie Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert

Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für den Blot zur N-terminalen Sequenzierung

45 % (v/v) Methanol, 9 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, filtriert, bei RT lichtgeschützt gelagert

Coomassie Brilliant Blue-Entfärbelösung für die N-terminale Sequenzierung

50 % Methanol, 40 % Millipore H_2O , 10 % Essigsäure

Protogel

30 % (v/v) Acrylamid, 0,8 % (v/v) Bisacrylamid, bei 4 °C gelagert

SDS-PAGE Trenngelpuffer

0,4 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

0,4 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

SDS-PAGE Laufpuffer (resultierender pH-Wert: 8,5)

0,1 % (w/v) SDS, 0,025 M Tris, 0,2 M Glycin

SDS-PAGE Laufpuffer für die N-terminale Sequenzierung

0,1 % (w/v) SDS, 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin

SDS-PAGE Probenpuffer (2x):

2 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 1,25 M Tris/HCl, pH 6,8

Sucrose-Farbmarker (6x Ladepuffer für native Gelelektrophorese)

60% (w/v) Saccharose

0,05% (w/v) Bromphenolblau

0,05% % (w/v) Xylencyanol FF

In 0,5% TBE Puffer

50x Tris-Acetat-EDTA Elektrophoresepuffer (TAE) für native PAGE

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

50 mM EDTA

pH 6,9 einstellen

ad 1l Millipore

2.16 Software

ÄKTA Unicorn Version 5.01 (318)

GE HEALTHCARE

Bioedit V.7.0.9

IBIS BIOSCIENCES, Tom Hall

Cary Eclipse Version 1.1 (175)

VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002

Cary Win UV Version 3.0 (182)

VARIAN Australia Pty. Ltd. 2002

Chemstation B.04.01

AGILENT

Corel Draw Version 14

COREL Corp.

Deep View Swiss PDB Version 3.7

Guex & Peitsch 1997

Endnote Version 9

WINTERTREE Software Inc.

OptiQuant Version 02.50

Packard Instrument Co.

Origin 6.0 mit ITC Steuermodul

Microcal, Northampton

Pov Ray Version 3.1g

POV-Team

ProtParam	www.expasy.ch/tools/protparam.html
PyMOL™ 0.99rc6	DELANO SCIENTIFIC LCC.
Sedfit Version 11.9b	P. Schuck, National Institute of Health
Seqman™II	DNASTAR Inc.
SigmaPlot 8.0/10.0	SPSS INC.
Ultrascan II Version 9.9	B. Demeler, University of Texas
VectorNTI 10	INVITROGEN

3 Methoden

3.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Glaswaren und hitzestabile Verbrauchsmaterialien, wie z. B. Pipettenspitzen, wurden ebenso autoklaviert und anschließend bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Hitzelabile Lösungen wurden in Stammlösungen angesetzt und je nach Volumen durch einen Membranfilter der Porengröße 0,2 µm mittels einer Vakuumpumpe oder durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Lösungen für den Gebrauch an den chromatographischen Anlagen wurden bei Bedarf mindestens 30 min im Eksikkator entgast.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli* Stämmen

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 140 Upm (1 Liter Kultur) bzw. 220 Upm (5, 50 und 250 ml Kulturen) angezogen. Die Anzucht erfolgte in der Regel in LB-Medium. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (150 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol, 75 µg/ml Kanamycin, 12,5 µg/ml Tetrazyklin) aus einer tausendfach konzentrierten, steril filtrierten Stammlösung zugegeben.

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur kurzzeitigen Lagerung wurden die Platten oder Suspensionen gut verschlossen und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen hergestellt, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden. Hierzu wurde ein Aliquot einer üN-Kultur im Verhältnis 1:1 in 87 % Glycerin in einem sterilen Schraubdeckelgefäß aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur chemischen Transformation

Zur Präparation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach Inoue et al. (1990) wurden 500 ml SOB-Medium mit dem entsprechenden Stamm auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und

bei 37 °C und 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt, in 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (3200 x g, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert, erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 10 ml eiskaltem TFB II-Puffer aufgenommen. Sofort nach dem Resuspendieren wurden 100 µl Aliquots der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis überführt und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde ein Aliquot der Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit etwa 100 ng Plasmid-DNA (maximales Volumen: 20 µl) bzw. 10-20 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 40 bis maximal 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz nochmals für fünf Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium folgte eine einstündige Kur bei 37 °C im Schüttler bei 220 Upm, um die Antibiotikaresistenz auszubilden. Bei Transformation eines gereinigten Plasmids wurden 100 µl bzw. geeignete Verdünnungen der Zellsuspension auf Selektivagar ausplattiert. Bei Transformation eines Ligationsansatzes wurde die Zellsuspension für 1 min bei 1500 x g abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

3.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Elektrotransformation

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen nach Dower et al. (1988) wurden 50 oder 200 ml SOB-Medium mit den entsprechenden Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde 30 min auf Eis gekühlt, in 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen abzentrifugiert (3200 x g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut 15 min auf Eis gehalten. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und daraufhin erneut 15 min auf Eis gehalten. Die Zellen wurden nochmals abzentrifugiert und schließlich in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Nach einem letzten Inkubations- und Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig abgegossen und die Zellen auf Eis gestellt. Das erhaltene Zellpellet wurde in mindestens 1 ml sterilem Wasser aufgenommen und zu je 100 µl Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die so erhaltenen elektrisch kompetenten Zellen wurden entweder zur Transformation frisch verwendet oder bei -80 °C in 10 % Glycerin gelagert.

3.2.5 Vorbereitung von DNA für die Elektroporation

Bei einer Elektroporation muss die verwendete DNA-Lösung eine möglichst geringe Konzentration an Ionen enthalten, da diese beim elektrischen Puls in der Küvette einen Kurzschluss auslösen können. Deshalb muss jede DNA-Lösung, die in einem salzhaltigen Puffer vorliegt (z. B. Ligationsansatz), mindestens 1 h gegen Wasser dialysiert werden. Hierfür wurden 10-20 µl der DNA-Lösung auf die glänzende Seite eines Nitrocellulosefilters (MILLIPORE) aufgebracht, der in einer kleinen Petrischale auf MILLIPORE-Wasser aufgelegt wurde.

3.2.6 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden 100 µl der frischen elektrokompetenten Zellen mit maximal 20 µl salzfreier DNA-Lösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt. Nach dem elektrischen Puls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) im Elektroporator (bei erfolgreicher Elektroporation lag die Zeitkonstante zwischen 4,0 und 6,0 ms) wurden die Zellen sofort in 1,5 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurden Aliquots auf Selektivagar ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.7 Anzucht und Lagerung von *S. solfataricus*

S. solfataricus wurde bei 80 °C in Brock Medium pH 3 mit 0,1 bis 0,2 % Trypton angezogen. Die Anzucht erfolgte in 100 ml Serumflaschen mit je 20 ml Medium. Je Flasche wurden 50 ml sterile Luft mittels einer Spritze zugegeben. Zur Kultivierung im größeren Maßstab wurden 1 l Serumflaschen mit 500 ml Luft verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 55 Upm in den Schüttelinkubatoren des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Regensburg. Das Wachstum der Zellen wurde sowohl in einer Thoma-Zählkammer als auch über Messungen der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

Zur kurzzeitigen Lagerung (bis zu zwei Wochen) wurden die Flaschen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Wegen der nur geringen genetischen Stabilität und hohen spontanen Mutationsrate mancher *Sulfolobus* Stämme (Berkner & Lipps, 2008) wurden eine längere Lagerung bei Raumtemperatur vermieden und Kulturen ausschließlich aus Glycerinkulturen angeimpft. Zu deren Herstellung wurden 30 ml einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur für 30 min bei 4 °C und 3200 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Brock-Glycerin-Medium ($\frac{2}{3}$ Vol. Brock Medium ohne organische

Zusätze, pH 4,5 bis 5; $\frac{1}{3}$ Vol. 87% Glycerin) resuspendiert und in sterile Schraubdeckelgefäß überführt. Diese wurden ohne Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

3.2.8 Transformation elektrisch kompetenter *S. solfataricus* Zellen

Eine frische 50 ml Kultur von *S. solfataricus* PH1-16 mit einer OD_{600} zwischen 0,2 und 0,3 wurde auf Eis abgekühlt und bei 3200 x g bei 4 °C 20 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden dreimal mit 20 mM eiskalter Saccharose gewaschen und zwar mit 50, 25 und schließlich 1 ml.

Die Zellzahl wurde auf 10^{10} Zellen/ml (entsprechend einer 50 ml Kultur mit $OD_{600}=0,1$ nach Resuspension in 200 µl Saccharose) eingestellt und die Zellen anschließend auf Eis inkubiert. Für eine Transformation wurden 100 bis 300 ng, gegen Millipore Wasser dialysierte pMJ05 Plasmid-DNA mit 50 µl kompetenten Zellen gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem BioRad GenePulser XCell Elektroporator am Lehrstuhl für molekulare und zelluläre Anatomie der Universität Regensburg. Nach dem elektrischen Puls (1500 V, 25 µF, 400 Ω) im Elektroporator (bei erfolgreicher Elektroporation lag die Zeitkonstante zwischen 8,6 und 9,1 ms) wurden die Zellen sofort in 1 ml Brock Medium (0,1% Trypton, 10 µg/ml Uracil) aufgenommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 1 h bei 75 °C in einem Tischschüttelinkubator regeneriert (dabei wurden die Gefäße gelegentlich geöffnet, um die Luftzufuhr sicherzustellen) und anschließend in 50 ml vorgewärmtes Brock Medium (0,1% Trypton, 10 µg/ml Uracil) überführt. Nachdem diese eine OD_{600} von 0,5 erreicht war (2-3 Tage), wurden die Zellen in Selektivmedium ohne Uracil (Brock Medium mit 0,1% NZ-Amin) überimpft. NZ-Amin zeichnet sich durch einen geringeren Uracilgehalt als Trypton aus. Diese Kultur diente als Vorkultur für die Probeexpression (siehe Kapitel 3.4.1.1).

3.2.9 Anzucht und Lagerung von *T. kodakaraensis*

T. kodakaraensis wurde anaerob in Minimalmedium ($\frac{1}{2}$ SME-Medium-AA) oder Vollmedium ($\frac{1}{2}$ SME-Medium mit Hefeextrakt, Stärke und Pepton) (siehe Kapitel 2.13) bei 85° C kultiviert. Die Anzucht erfolgte in 100 ml Serumflaschen mit je 20 ml Medium bei 1 bar Überdruck N_2 . Zur Kultivierung im größeren Maßstab wurden 1 l Serumflaschen mit 400 ml und 0,5 bar N_2 verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 55 Upm in den Schüttelinkubatoren des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Regensburg. Bei der Fermentation im Großmaßstab wurden 100 l Fermenter aus dem Biotechnikum der Universität Regensburg verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Thoma-Zählkammer verfolgt.

Zur kurzzeitigen Lagerung (bis zu 4 Monate) wurden die Flaschen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden von Ingrid Waege Glycerinkulturen hergestellt, welche bei -196 °C in der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie aufbewahrt werden.

3.2.10 Hitzeschocktransformation bei *T. kodakaraensis*

Für die Transformation wurden in 20 ml Minimalmedium ½ SME-AA angezogene Kulturen von *T. kodakaraensis* KU216 in der späten exponentiellen Wachstumsphase ($1,0-1,5 \times 10^8$ Zellen / ml) verwendet. In der Anaerobenkammer wurden pro Transformationsansatz 3 ml der Kultur entnommen, auf zwei Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und abzentrifugiert (10 min bei 6000 x g). Die Zellpellets aus je zwei Eppendorf Röhrchen wurden in insgesamt 0,1 ml Transformationspuffer resuspendiert und in ein 0,5 ml PCR Gefäß überführt. Im Thermocycler wurden die Zellen in der Anaerobenkammer insgesamt 1,5 h bei 4°C (Deckel 95°C) inkubiert, wobei nach 30 min pro Transformationsansatz 1 pmol Vektor DNA (pJET1.2 $\Delta trpB2o$, pJET1.2 $\Delta trpB1$ bzw. pJet1.2 $\Delta hisD::trpB1$) zugegeben wurde (bei der Negativkontrolle wurde die DNA durch Puffer ersetzt). Im Thermocycler wurden die Ansätze eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert, danach erfolgte der Hitzeschock 3 min bei 80°C und zuletzt wurden die Ansätze für 10 min erneut bei 4°C gekühlt.

Mit den Transformationsansätzen wurden Serumflaschen mit 20 ml Minimalmedium ½ SME-AA ohne Uracil beimpft. Bei den KU216 $\Delta trpB2o$ und KU216 $\Delta hisD::trpB1$ Ansätzen wurde dabei zum Teil auch auf die Zugabe von Tryptophan zum Medium verzichtet, bei den KU216 $\Delta trpB1$ Transformationen dieses jedoch stets zugesetzt.

Nach entsprechender Inkubation bei 85°C wurden die bewachsenen Transformationsansätze mehrmals in entsprechendem Flüssigmedium (ohne Uracil, +/- Tryptophan) überimpft. Zur Gewinnung von Reinkulturen wurden die bewachsenen Kulturen auf ½ SME-AA Gelrite Platten ausplattiert und bei 85°C im Hybridisierungssofen in der Anaerobenkammer inkubiert. Mit einzeln liegenden *T. kodakaraensis* KU216 Transformanten wurden Reinkulturen in ½ SME-AA (-Ura, +/- Trp) Flüssigmedium hergestellt. Die korrekte Integration der Selektionsmarker wurde über PCR und Southern Blot Analyse verifiziert (Waege, 2009)

3.2.11 Erstellung von Wachstumskurven mit *T. kodakaraensis*

Zur Erstellung von Wachstumskurven bei 85 °C wurde vom jeweiligen Stamm (KU216, KU216 $\Delta trpB1$, KU216 $\Delta trpB2$) eine Vorkultur sowohl in 20 ml ½ SME-AA Medium (+Trp/ +Ura) als auch in 20 ml ½ SME-AA Medium (-Trp/ -Ura) angelegt. Nach identischer Inkubationszeit wurden die Zelldichten (Zellzahl/ml) der Ansätze mit Hilfe einer Thoma-

Zählkammer bestimmt, und je zwei 20 ml desselben Mediums mit möglichst identischer Zellzahl ($1,0 \times 10^6$ Zellen/ml) aus diesen Vorkulturen beimpft. Die Inkubation der Ansätze erfolgte in Schüttelinkubationsschränken am Lehrstuhl für Mikrobiologie. Um die am Anfang der Inkubation auftretende lag-Phase zu überbrücken, wurden die Kulturen abends angeimpft und nach 10 h mit den ersten Messungen der Zellzahlen mit der Thoma-Zählkammer begonnen. Danach wurde die Zelldichte regelmäßig einmal pro Stunde bestimmt, wobei bei der Probenentnahme auf eine kurze Verweildauer der Serumflaschen bei Raumtemperatur geachtet wurde, um den Einfluss der Temperaturschwankungen auf das Wachstum zu minimieren.

3.2.12 Herstellung von organischen Extrakten aus *T. kodakaraensis*

Um den Gehalt an Indolderivaten zwischen *T. kodakaraensis* Wildtyp (KU216) und $\Delta trpB2o$ zu vergleichen, wurden organische Extrakte des Zellmaterials und auch der Überstände des bewachsenen Mediums erzeugt. Dazu wurde über Fermentation im 100 l Maßstab im Biotechnikum der Universität Regensburg ausreichend Zellmaterial beider Stämme gewonnen. Die Fermentation wurde von Thomas Hader und Konrad Eichinger durchgeführt. Als Medium wurde $\frac{1}{2}$ SME-AA (-Trp) verwendet (2.13), wobei die Aminosäuren und bei Bedarf 5 mg/ml anaerobes und steriles Uracil (beim KU216 Stamm) nach Sterilisation und Begasung des Grundmediums direkt zum Fermenter zugegeben wurden. Als Vorkultur dienten 400 ml spätlogarithmische Kultur des jeweiligen Stammes in $\frac{1}{2}$ SME-AA (-Trp, +/Ur. Uracil). Die Fermenter wurden mit 5×10^4 bis 5×10^5 Zellen/ml angeimpft, wobei der Zeitpunkt anhand von Wachstumskurven so gewählt wurde, dass am nächsten Tag eine Ernte in der spätlogarithmischen Phase erfolgen konnte. Die Ernte erfolgte über Durchflusszentrifugation bei 4 °C. Die gräulichen Zellpellets (30 bis 40 g Nassgewicht) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Gewinnung von Extrakten aus den Fermentationsüberständen wurden mehrere Liter von beiden Stämmen ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Um organische Extrakte der zellulären Fraktionen vom wildtypischen und vom $\Delta trpB2o$ Stamm zu erzeugen, wurden 12 bis 20 g Zellen eingewogen und in je 150 ml Methanol (HPLC grade) aufgeschlämmt (Rabinowitz & Kimball, 2007). Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizieren mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Sonifier 250D, 4x1min, 70% Makrospitze, 4°C). Anschließend wurde die erhaltene Zellschlacke für 5 min in einem Ultraschallbad resuspendiert und die grau-trüben Überstände ü. N. im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4200 x g, 30 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde erneut in 150 ml Methanol resuspendiert, ü. N. bei 4°C inkubiert, schließlich erneut wie oben sonifiziert und nochmals abzentrifugiert. Die beiden

Überstände wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden in 1 bis 3 ml Methanol resuspendiert, wobei an dieser Stelle eine Normierung auf die ursprüngliche Einwaage (12-20 g Zellen) stattfand. Anschließend wurden die Proben durch Zentrifugation in Amicon Ultra 4 Zentrifugenröhrchen (Ausschlussvolumen 10 kDa) von hochmolekularen Bestandteilen befreit (3.4.2.6). Die Amicon Zentrifugenröhrchen wurden, um Kontamination der Probe zu verhindern, vorher mit 0,1 N NaOH, 50 mM KP, pH 7,5, Millipore Wasser und schließlich mit Methanol (HPLC grade) gewaschen. Der Durchfluss mit niedermolekularen Metaboliten wurde bei 4 °C gelagert und einer HPLC Analyse unterzogen (3.5.11).

Um sicherzustellen, dass die Normierung auf die Einwaage den tatsächlichen Gehalt an Zellmaterial widerspiegelte und nicht durch unterschiedlichen Gehalt an Wasser oder kolloidal gelöstem Schwefel verfälscht wurde (vgl. Kapitel 4.2.6 im Ergebnisteil), wurde der Proteingehalt von in gleicher Weise auf die Einwaage normierten Zellen verglichen. Dazu wurden Zellen (50-100 mg Nassgewicht) in denaturierendem Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 2,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, Volumen 500-1000 μ l, normiert auf Einwaage) statt Methanol aufgeschlossenen (3 x 30 s, 20 %, Mikrospritze) und je 5 μ l des Rohextrakts über SDS-PAGE bezüglich ihres Proteingehalts quantifiziert (3.5.3).

Um organische Extrakte der Überstände des bewachsenen Mediums zu erzeugen, wurden jeweils 600 ml beider Fermenterüberstände einer fraktionierten, erschöpfenden Extraktion unterzogen, wobei die verwendeten Lösungsmittel eine zunehmende Hydrophilie aufwiesen (Chloroform/ $\text{NH}_3 \rightarrow$ Ethylacetat \rightarrow 1-Butanol). Dazu wurde der Überstand dreimal mit je 200 ml Chloroform, 2,5% (v/v) Ammoniak ausgeschüttelt. Der sich bildende graue Niederschlag in der organischen Phase wurde über Abnutschen durch einen Papierfilter entfernt und die organischen Eluate vereint. Anschließend wurde die wässrige Phase mit dreimal 200 ml Ethylacetat ausgeschüttelt, wobei sich ein leicht gräulicher Niederschlag in der organischen Phase bildete, der wiederum abfiltriert wurde. Als drittes Extraktionsmittel wurden dreimal 200 ml 1-Butanol verwendet, wobei sich kein Niederschlag mehr bildete.

Die Chloroform und Ethylacetat Extrakte wurden jeweils bei 40 °C, die 1-Butanol Extrakte und die wässrigen Rückstände der Extraktion bei 50 °C bis zur Trockene im Rotationsverdampfer eingengt. Die Chloroform Extrakte hinterließen gelbliche, die Ethylacetatextrakte weißliche Rückstände, welche in je 5 ml Methanol gelöst wurden. Die butanolischen Extrakte zeigten große Mengen roten, die wässrige Phase weiß-gelbliche Rückstände, welche in je 10 ml Methanol gelöst wurden. Alle resuspendierten Extrakte wiesen unlösliche Bestandteile auf, welche durch Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4 °C) abgetrennt werden konnten. Die Pellets wurden in 5 ml Acetonitril aufgenommen und ü. N. im Kühlraum inkubiert. Somit wurden je Extraktionsmittel und Stamm zwei Extrakte (in Methanol und in Acetonitril) gewonnen, was zu einer Gesamtzahl von jeweils acht Extrakten

für den wildtypischen und den $\Delta trpB2o$ Stamm führte. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei 4 °C. Entsprechende Extrakte aus beiden Stämmen wurden bezüglich ihres Gehalts an Metaboliten über *reversed phase* HPLC verglichen (3.5.11).

3.2.13 Anzucht von *T. maritima*

T. maritima MSB8 (Huber et al., 1986) wurde vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden anaerob in MM-I Medium (2.14) bei 65 bis 85 °C kultiviert. Die Anzucht erfolgte in 100 ml Serumflaschen mit je 20 ml Medium bei 1 bar Überdruck N₂. Zur Kultivierung im größeren Maßstab wurden 1 l Serumflaschen mit 400 ml und 0,5 bar N₂ verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 55 Upm in den Schüttelinkubatoren des Lehrstuhls für Mikrobiologie. Das Wachstum wurde in einer Thoma-Zählkammer verfolgt. Zur kurzzeitigen Lagerung (bis zu 4 Monate) wurden die Flaschen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus *S. solfataricus* und *T. kodakaraensis*

Von logarithmisch gewachsenen Kulturen wurden 10 bis 30 ml über Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden in 250 µl TEN-Puffer resuspendiert und eine Spatelspitze Trypsin und Proteinase K hinzugefügt. Zur Zelllyse wurden 250 µl TENST-Puffer zugegeben und der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde zweimal mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, wobei jeweils durch Zentrifugation (16100 x g, 10 min, RT) die Phasentrennung beschleunigt wurde. Die obere, wässrige Phase wurde mit 500 µl Chloroform extrahiert und wiederum 10 min zentrifugiert. Um die DNA zu präzipitieren, wurden zur wässrigen Phase $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und zwei Volumen absoluten Ethanols gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurde die gefällte DNA 10 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und 5 min zentrifugiert. Die DNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.3.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Le Gouill et al., 1994). Durch Zugabe von SDS und NaOH werden die Zellen zunächst aufgeschlossen. Anschließend werden die Proteine und die genomische DNA durch

Neutralisation der Suspension unter Zugabe von Ammoniumacetat gefällt, während die zirkuläre Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

3.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation)

Die analytische Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen oder mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas. Dazu wurden aus einer frischen ü. N. Kultur 5 ml Zellsuspension abzentrifugiert (16000 x g, 1 min, RT). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Zur Elution wurden stets 50 µl steriles Wasser bzw. der dem Kit beiliegende Elutionspuffer verwendet und die gewonnene DNA bei -20 °C gelagert.

3.3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA zu präparativen Zwecken erfolgte durch das NucleoBond PC 100 (Midi-Präparationen) von Macherey-Nagel.

Dazu wurden 50 ml einer *E. coli* ü. N. -Kultur abzentrifugiert (3200 x g, 10 min, 4 °C). Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der AX100 Säulen. Der Elutionsschritt wurde mit 50 µl sterilem Wasser durchgeführt. Die Plasmidpräparation wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz entspricht eine OD₂₆₀ von 1 (mit $0,1\% A_{260} = 20 \text{ cm}^2 \text{mg}^{-1}$ und einer Küvetten-Schichtdicke von 1 cm) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA (bzw. 35 µg/ml RNA oder 33 µg/ml ssDNA).

Dadurch kann die DNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$c_{dsDNA} = \frac{A_{260} \cdot 50 \cdot f}{1000}$$

Formel 1: Bestimmung der DNA-Konzentration.

c_{dsDNA} Konzentration an doppelsträngiger DNA [µg/µl]

A_{260} Absorption bei 260 nm

f Verdünnungsfaktor

Eine saubere DNA-Lösung sollte oberhalb von 300 nm keine messbare Absorption zeigen und einen OD₂₆₀/OD₂₈₀ Quotienten von mindestens 1,8 aufweisen.

3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Durch Zugabe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid werden die Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar (Sharp *et al.*, 1973). Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 1 % (w/v) Agarose in 0,5 % TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf 50–60 °C wurden 0,2 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) pro ml Agarose hinzugegeben, die Lösung in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Erkalten wurde das fertige Gel mit 0,5 % TBE-Puffer überschichtet und der Taschenkamm wieder entfernt. Die DNA-Proben wurden bei Bedarf mit 6× DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 190 V für etwa 20 min durchgeführt.

Mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden die DNA-Fragmente detektiert und mit Hilfe des Imager Multi-Doc-It Digital Imaging System die Gele dokumentiert. Als Größenstandard wurden 5 µl des GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder von Fermentas verwendet.

3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm wurden gewünschte Fragmentbanden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleospin II-Kits von Macherey-Nagel laut Anleitung des Herstellers. Nach einer PCR wurde die isolierte DNA in 40 µl, nach einem präparativen Verdau in 30 µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Für die Extraktion von großen DNA Fragmenten (> 10 kb), wie beispielsweise dem geschnittenen pMJ05 Vektor, wurde der QIAEX II Gelextraktionskit von Qiagen laut Herstellerangaben verwendet.

3.3.6 Enzymatische Manipulation von dsDNA

3.3.6.1 Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die spezifische Spaltung von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet (Sambrook *et al.*, 1989, Wilson & Murray, 1991), die eine palindromische Erkennungssequenz besitzen. Diese erzeugen einzelsträngige Überhänge, sogenannte *sticky ends* mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Für analytische Spaltungen wurde maximal etwa 1 µg DNA mit 10 U von jedem Restriktionsenzym für 2 bis 3 h in einem Volumen von ca. 50 µl in entsprechendem Puffer bei 37 °C inkubiert. Für präparative Spaltungen zur späteren Ligation von Fragmenten wurde die gesamte Menge an erhaltenem

PCR-Produkt und 2 µg Vektor-DNA mit 10 bis 30 U von jedem Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von je 50 µl verdaut. Die Inkubation erfolgte in Abhängigkeit des Restriktionsenzyms bei 37 °C für 2 h bzw. üN. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (3.3.4) und für die Ligation aus dem Gel aufgereinigt (3.3.5).

3.3.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden geschnittener Vektor und Fragment in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 4 gemischt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) im entsprechenden Puffer üN bei 16 °C im Thermocycler oder 1 h bei RT. Danach wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ansatz chemisch (3.2.3) oder elektrisch (3.2.6) transformiert.

3.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine in vitro Methode zur enzymatischen Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente (Mullis & Faloona, 1987). Sie ermöglicht die selektive Vervielfachung des DNA-Templates auch aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (*annealing*) und Verlängerung (*extension*) zweier Oligonukleotid-Primer, die auf gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer doppelsträngigen DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen aufgeschmolzen und somit in Einzelstrang-DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der *annealing*-Phase kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Zielregionen der einzelsträngigen Matrizen-DNA. In der Extensions-Phase werden bei höherer Temperatur die Primer durch eine thermostabile Polymerase komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es zu einer exponentiellen Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz.

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und dem G/C-Gehalt der jeweiligen spezifischen Primer festgelegt. Die Reaktionen wurden in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 5-100 ng Matrizen DNA, 1 µM eines jeden Primers, 1,25 U GoTaq Polymerase und $\frac{1}{5}$ Volumen 5 x Green GoTaq Reaktionspuffer. Für die Gewährleistung von *proof reading* Aktivität wurden 2,5 U Pwo-Polymerase hinzugefügt. Alternativ zu der Mischung aus GoTaq und Pwo wurde die

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach einer anfänglichen Denaturierung für 3 Minuten bei 95 °C wurde der eigentliche Reaktionszyklus gestartet. Die Denaturierung erfolgte in der Regel für 45 s bei 95 °C, das Primer-*annealing* für 45 s bei der für das jeweilige Primerpaar charakteristischen Temperatur und die Extension für 1 min/kb bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 30-mal durchlaufen und nach einer abschließenden Extension für 10 Minuten bei 72 °C der Ansatz auf 4°C abgekühlt. Die Schmelztemperatur T_M eines Primers wurde mit dem Programm VectorNTI berechnet und die Primer so gewählt, dass sie sich in ihrer Schmelztemperatur möglichst ähneln. Die *annealing* Temperatur T_A wurde 3 °C unter der berechneten Schmelztemperatur T_M gewählt.

3.3.8 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung wurde ein Insert-*screening* mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden auf Selektivplatten gewachsene Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt und bei dem Denaturierungsschritt von 95 °C aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Platte gepickt und kurz auf dem Boden des PCR-Gefäßes verstrichen. Die freigesetzte DNA diente in den folgenden Amplifikationsrunden als Matrize. Als Primer wurden in der Regel genflankierende Plasmidprimer eingesetzt. Das Volumen des Ansatzes betrug jeweils 20 µl. Im Ansatz waren je 1 U GoTaq DNA-Polymerase, 5x Green GoTaq Reaktionspuffer, 0,1 mM dNTPs und 0,5 µM der Primer enthalten. Die Amplifizierung erfolgte mittels Standard-Protokoll wie in 3.3.7 beschrieben.

3.3.9 PCR-Methoden zur gerichteten Mutagenese

3.3.9.1 Megaprimer-PCR (Sarkar & Sommer, 1990)

Die Megaprimer-PCR ist eine Form der DNA-Manipulation, mit der gerichtet Punktmutationen eingeführt werden. In einer ersten PCR wird der Megaprimer hergestellt, indem mit Hilfe eines genflankierenden Primers und eines Primers, der die Mutation enthält, ein Fragment (der Megaprimer) amplifiziert wird. Dieser Megaprimer wird mittels präparativer Gelelektrophorese (3.3.5) gereinigt und dient zusammen mit dem das Gen auf der gegenüberliegenden Seite flankierenden Primer zur Amplifizierung des gesamten Gens in einer zweiten PCR. Die erste und zweite PCR wurden nach beschriebener Methode (3.3.7) durchgeführt. Die optimale Anlagerungstemperatur T_A wurde, wenn nötig, experimentell ermittelt.

In der Regel wurde diese Methode gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position innerhalb der ersten oder letzten 100 Nukleotide eines Gens lag.

3.3.9.2 *Overlap Extension*-PCR (Ho et al., 1989)

Bei der *Overlap Extension* (OE)-PCR zur gerichteten Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von 25 bis 35 bp Länge definiert, die im zentralen Bereich den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Im ersten Schritt werden in getrennten PCR-Ansätzen mit diesen Primern in Kombination mit je einem genflankierenden Primer von der gleichen Matrize zwei überlappende Genfragmente amplifiziert und mittels präparativer Gelelektrophorese (3.3.5) gereinigt. Diese Fragmente überlappen im Bereich der ausgetauschten Nukleotide und dienen in einer zweiten PCR als Matrize, um in Kombination mit genflankierenden Primern das vollständige Gen mit den ausgetauschten Nukleotiden zu amplifizieren.

Diese Mutagenisierungsmethode wurde gewählt, wenn die zu mutagenisierende Position relativ mittig im Gen lag, so dass die beiden überlappenden Fragmente eine vergleichbare Länge aufwiesen. Die Amplifizierung erfolgte mittels Standard-Protokoll wie in 3.3.7 beschrieben.

3.3.10 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen von mutagenisierten und klonierten Genen erfolgte durch die Firma Geneart (Regensburg, www.geneart.com). Es wurde das Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) verwendet. Bei diesem Verfahren werden verschiedene fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden in der *Thermal Cycle Sequencing* Reaktion (Sears et al., 1992; Slatko, 1994) eingesetzt. Dadurch entstehen 3'-terminal fluoreszenzmarkierte Einzelstrang-Abbruchfragmente, die gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Nukleotidsequenz wurde anschließend auf einem ABI PRISM 3700 DNA Analyzer von Applied Biosystems ausgelesen. Die abgegebenen Proben mit einem Gesamtvolumen von 8 µl enthielten zwischen 100 und 300 ng DNA und jeweils 10 pmol eines Sequenzierungsprimers, wodurch die DNA linear amplifiziert wurde. Die im ABI-Format erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm SeqMan analysiert.

3.4 Proteinchemische und organisch-chemische Methoden

3.4.1 Genexpression und Proteinanreicherung

3.4.1.1 Expression und Anreicherung von Proteinen im analytischen Maßstab

Alle zu exprimierenden Gene im *E. coli* Wirtssystem lagen in Vektoren der pET-Serie (Novagen) vor und standen somit unter Kontrolle des T7 Promotor- und *lac* Operator-Systems (2.2.1). Um zu untersuchen, ob sich die klonierten Gene überexprimieren lassen, wurden Expressionen im analytischen Maßstab (Probeexpressionen) durchgeführt. Dazu wurden mit einer frisch transformierten *E. coli* Kolonie 5 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden weitere 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz auf zwei Kolben aufgeteilt. In einem Kolben wurde die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert, im anderen kein IPTG zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert, in 400 µl Aufschlusspuffer resuspendiert und mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier, Model 250 D; Amplitude 20 %, 20 Sekunden mit einer 4 mm Mikrospritze) aufgeschlossen. Die Proben wurden in der Tischzentrifuge (16000 x g, 10 min, 4 °C) zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen (P) wurde in 400 µl Aufschlusspuffer resuspendiert, 100 µl davon in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Untersuchung des löslichen Zellextrakts (*crude extract* oder Rohextrakt, C) wurden 100 µl des Überstands in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen 2 x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt.

Um die Menge von nur schlecht löslichen Proteinen, wie z.B. sTrpB2i, quantifizieren zu können, wurden Metallaffinitätsreinigungen im Kleinstmaßstab durchgeführt. Dazu wurden zunächst 50 µl Chelating Sepharose Fast Flow (GE HEALTHCARE) in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mit 2 ml Wasser und dann 2 ml Lysepuffer (z.B. 10 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 5 mM Imidazol) durch Zentrifugation (15 s *fast spin* in einer Eppendorf Tischzentrifuge) gewaschen. Zum gewaschenen Säulenmaterial wurden 400 µl des Überstands der aufgeschlossenen Zellen gegeben und 1 h bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit zweimal 2 ml Lysepuffer über Zentrifugation gewaschen. Die Elution des Zielproteins vom Säulenmaterial erfolgte nach Zugabe von 50 µl 2 x SDS-Auftragspuffer durch Inkubation bei 95 °C für 5 min (Probe Ni). Die drei mit SDS-Probenpuffer versetzten Aliquots (P, C, Ni) wurden per SDS-PAGE (3.5.3) analysiert.

Zum Test von *fed batch* Verfahren für die Expression von sTrpB2i wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Enbase OptiSet, BIOSILTA, Oulu, Finnland) verwendet. Bei diesem Verfahren werden höhere Zelldichten als bei der klassischen *batch* Kultivierung in Schüttelkolben (siehe oben) erreicht, indem durch kontrollierte Freisetzung von Glucose aus einer stärkehaltigen Gelmatrix durch Amylasen (*fed batch*) ein gleichmäßiges Wachstum ohne Sauerstofflimitierung und pH-Absenkung des Mediums erzielt wird. Im Testkit werden im 24 *well* Mikrotierplattenformat LB Medium mit verschiedenen Medien (Minimalmedium MSM mit stärkehaltiger Gelmatrix, flüssiges modifiziertes TB Medium „Enbase Liquid“, flüssiges modifiziertes TB Medium mit stärkehaltiger Gelmatrix) verglichen. Hierbei wird die Menge an zugesetzten Amylasen (Bezeichnung des Herstellers „Enzl'M“) variiert, um eine für das zu exprimierende Protein optimale Glucosefreisetzung zu ermitteln. Zum Test der Expression von sTrpB2i wurde eine BL21(DE3) RIPL pet21a sTrpB2i Vorkultur [(His)₆-Affinitätstag am C-Terminus] verwendet und die Probeexpression lt. Herstellerangaben durchgeführt. Die Menge an löslichem sTrpB2i wurde durch die oben beschriebenen Metallaffinitätsreinigungen im Kleinstmaßstab quantifiziert.

Zur Probeexpression von Proteinen im *S. solfataricus* Wirtssystem wurden mit dem pMJ05 Expressionskonstrukten transformierte *S. solfataricus* PH1-16 Zellen (2.1, 2.2.2, 3.2.8) in 20 ml Brock Medium mit 0,1 % NZ-Amin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen (3.2.7). Durch Zugabe von 0,2% D(+) Arabinose wurde die Proteinexpression induziert. Nach Inkubation für 36 h bei 80 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (3600 x g, 30 min, 4 °C) pelletiert, in 400 µl Aufschlusspuffer resuspendiert und mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier, Model 250 D; Amplitude 25 %, 2x30 Sekunden mit einer 4 mm Mikrospritze) aufgeschlossen. Die Proben wurden in der Tischzentrifuge (16000 x g, 10 min, 4 °C) zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen (P) wurde in 400 µl Aufschlusspuffer resuspendiert, 100 µl davon in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Untersuchung des löslichen Zellextrakts (*crude extract* oder Rohextrakt, C) wurden 100 µl des Überstands in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen 2 x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt. Die beiden mit SDS-Probenpuffer versetzten Aliquots (P, C) wurden per SDS-PAGE (3.5.3) und anschließendem Western Blot (3.5.6) analysiert.

3.4.1.2 Expression und Anreicherung von Proteinen im präparativen Maßstab

Um Proteinmengen im Milligramm-Maßstab zu reinigen, wurden Großexpressionen im präparativen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden mit einer frisch transformierten *E. coli* Kolonie 50 - 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden 1 bis 10 l LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀=0,6

inokuliert. In Einzelfällen wurde die Temperatur herabgesetzt, insbesondere dann, wenn die Probeexpression gezeigt hatte, dass sich der Großteil des hergestellten Proteins in der Pelletfraktion befand (tmTrpB1, tmTrpB2, sTrpB2a) (Bolz, 2006; Leopoldseder, 2005). Bei der Expression von sTrpA und tmTrpA wurde dem Medium 20 mM Kaliumphosphat Puffer (KP) zugesetzt, um durch die Bindung der Phosphationen an das aktive Zentrum die Stabilität und Löslichkeit des erzeugten Proteins zu erhöhen. Zeigte die Probeexpression an, dass eine Induktion mit IPTG notwendig war, wurde beim Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600}=0,6$ 0,5 mM IPTG zugegeben. Nach Wachstum über Nacht wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (2700 x g, 15 min, 4 °C).

Um höhere Ausbeuten des nur in geringen Mengen löslichen Proteins sTrpB2i (Leopoldseder, 2005) zu erhalten, kam die bereits im Rahmen der Probeexpression getestete *fed batch* Kultivierung der Firma Biosilta (Oulu, Finnland) zum Einsatz. Im präparativen Maßstab wurde sowohl das Enbase Shake Flask Kit (Glucose wird über eine Gelmatrix ins Kulturmedium freigesetzt) als auch das Enbase Flo Kit (Glucose wird aus einem flüssigen Glucosespeicher kontrolliert freigesetzt) getestet. Bei Verwendung des Enbase Shake Flask Kit wurde die Gelmatrix laut Herstellerangaben in 1 l Erlenmeyer Kolben mit Schikanen gegossen und mit 150 ml Enbase Medium (Zubereitung lt. Herstellerangaben unter Zusatz von 0,6 U/l Enzl'M) gefüllt. Eine ü. N. Kultur von BL21(DE3) RIPL pet21a sTrpB2i diente als Vorkultur, wobei die Zellen vor Verwendung über Zentrifugation (2700 x g, 10 min, 4 °C) mit 30 ml Enbase Medium gewaschen und anschließend in 30 ml Enbase Medium aufgenommen wurden. Nach Animpfen auf eine OD_{600} von 0,15 wurden die Kulturen ü. N. in einem Schüttelinkubator (Schüttelamplitude 25 mm, 180 Upm, 30 °C) inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD_{600} von 25,5 mit 3,3 mM IPTG und nach weiterer Kultivierung für 24 h wurden bei einer OD_{600} von 30 die Zellen geerntet (2700 x g, 15 min, 4 °C). Bei Verwendung des Enbase Flo Kit wurden 250 ml Enbase Medium laut Herstellerangaben in 3 l Erlenmeyer Schikanenkolben mit 0,6 U/l Enzl'M versetzt. Eine ü. N. Kultur von BL21(DE3) RIPL pet21a sTrpB2i diente als Vorkultur, wobei die Zellen vor Verwendung mit Enbase Medium, wie für das Shake Flask Kit beschrieben, gewaschen wurden. Nach Animpfen auf eine OD_{600} von 0,15 wurden die Kulturen 48 h in einem Schüttelinkubator (Schüttelamplitude 25 mm, 245 Upm, 30 °C) inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD_{600} von 5 mit 4 mM IPTG, unter Zusatz von *booster* und Enzl'M lt. Herstellerangaben. Nach weiterer Kultivierung für 24 h bei 37 °C wurden bei einer OD_{600} von 5 die Zellen geerntet (2700 x g, 15 min, 4 °C).

Für die Expression mit dem Wirtssystem *S. solfataricus* wurden analog zur Probeexpression (3.4.1.1) vorgegangen, wobei zweimal 400 ml Zellen in Serumflaschen bei 80 °C angezogen, bei einer OD_{600} von 0,3 mit 0,2% Arabinose induziert und nach 36 h bei 80 °C geerntet wurden (2700 x g, 15 min, 4 °C).

Nach erfolgter Zellernte wurden die Zellpellets in 25 ml Aufschlusspuffer pro Liter Expressionsmedium (bei Enbase Expressionen 120 ml pro Liter) resuspendiert. Für sTrpB2i und sTrpB2a wurde 10 mM KP, pH 7,5, 40 μ M PLP, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol verwendet, für sTrpA 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol (bei Mutanten mit zusätzlichem Cystein wurden 1 mM TCEP zugegeben). Für tmTrpB1, tmTrpB2o und tmTrpA wurden die wie bei Bolz (2006) beschrieben, 100 mM KP, pH 7,5, 40 μ M PLP, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol (tmTrpB1, tmTrpB2) bzw 10 mM KP, pH 7,5 (tmTrpA) als Aufschlusspuffer verwendet. Das Hilfsenzym tmGAPDH wurde in 100 mM KP, pH 7,5, 40 μ M PLP, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in 50 ml Falconröhrchen durch Sonifizieren mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier Model 250 D; Amplitude 50 %, Makrospitze, 2 x 2 min mit jeweils 30 s Puls und 30 s Pause). Die Probe wurde während der gesamten Prozedur auf Eis gehalten, um eine übermäßige Erwärmung der Lösung zu vermeiden. Anschließend wurden wie bei der Probeexpression unter 3.4.1.1 beschrieben, je 100 μ l Aliquots der löslichen (C) und unlöslichen (I) Zellfraktion entnommen. Die restliche Probe wurde scharf zentrifugiert (23400 x g, 15 min, 4 °C), der Überstand in 50 ml Falconröhrchen überführt und zur Reinigung der rekombinanten Proteine verwendet (3.4.2).

3.4.1.3 Herstellung von löslichen Proteinrohextrakten aus *S. solfataricus* und *T. maritima*

Zur Herstellung von löslichen Proteinrohextrakten aus *S. solfataricus* PBL2025 (2.1) wurden 400 ml Kulturen in 1 l Serumflaschen bei 80 °C in Brock Medium mit 0,1% Trypton bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen (3.2.7). Für Extrakte aus *T. maritima* wurden ebenfalls 400 ml Kulturen in MM-I Medium bei 85 °C bis zu einer Zelldichte von 1 bis 2 x 10⁸ Zellen/ml angezogen. Die Zellernte erfolgte in beiden Fällen durch Zentrifugation (3600 x g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde je nach Bedarf in 1 ml unterschiedlicher Lysepuffer (2.15.2) resuspendiert, der Aufschluss erfolgte durch dreimaliges Sonifizieren mit einem Ultraschall Desintegrator (Branson Digital Sonifier Model 250 D, Amplitude 20 %, 3 x 30 s, 4 mm Mikrospitze) wie beschrieben (3.4.1.2). Unlösliche Bestandteile des erhaltenen Zelllysats wurden durch Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Die Überstände wurden anschließend über Anionentauscherchromatographie (3.4.2.3) oder Gelfiltrationschromatographie (3.5.9) weiter analysiert.

3.4.2 Proteinreinigung aus der löslichen Zellfraktion

Die Reinigung von tmTrpB1, tmTrpA und tmTrpB2o erfolgte, wie bei Bolz (2006) beschrieben, mittels Affinitätschromatographie (tmTrpB1, tmTrpB2o) oder Anionentauscher-

chromatographie (tmTrpA) und wird an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt. Die Reinigung von in pet28a kloniertem tmGAPDH mit N-terminalem His₆ tag (pet28a tmGAPDH) erfolgte in analoger Weise zu tmTrpB1.

3.4.2.1 Hitzeschritt

Eine erste Aufreinigung der rekombinant in *E. coli* hergestellten, thermostabilen Proteine erfolgte mittels Hitzeschritt. Dazu wurden die löslichen Zellextrakte für 20 Minuten in ein auf 65 °C (sTrpB2i) oder 75 °C (sTrpA, sTrpB2a) geheiztes Wasserbad gestellt und gelegentlich geschwenkt. Anschließend wurde wieder scharf zentrifugiert (23400 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und ein 100 µl Aliquot abgenommen (H). Die Probe H wurde ebenso wie P und C (siehe 3.4.1.2) mit 2 x SDS Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die weitere Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über Metallchelate-Affinitätschromatographie.

3.4.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde mit der Säule HisTrap FF crude (GE HEALTHCARE; CV: 5 ml; max. Druck: 0,5 MPa) durchgeführt. Diese Säule besteht aus Sepharose 6 (FastFlow) Medium und dem daran gebundenem Chelator Iminodiäthylsäure (IDA). IDA besitzt sechs Koordinationsstellen, wobei an drei Koordinationsstellen Metallionen (Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ oder Fe³⁺) immobilisiert werden können, während die anderen drei zur Komplexbildung von Stickstoff- und Schwefelatomen von Histidinen, Tryptophanen oder Cysteinen zur Verfügung stehen. Proteine, die gentechnisch mit einem N- oder C-terminalem (His)₆-tag fusioniert wurden, binden nach Beladung der Säule mit Metallionen (in dieser Arbeit wurde stets Ni²⁺ verwendet) spezifisch an die Säule, da die Metallionen zusätzliche Koordinationsstellen für die Histidine bereitstellen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgt durch Anlegung eines Imidazolgradienten, wobei die Imidazolmoleküle mit den chemisch äquivalenten Histidin-Seitenketten des rekombinanten Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren. In den Auftragspuffern darf sich weder EDTA noch DTT befinden. EDTA würde die gebundenen Nickelionen komplexieren und damit von der Säule entfernen, während DTT die Ionen zu elementarem Nickel reduzieren würde.

Die Beladung der Säule mit Nickelionen erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde bei Bedarf durchgeführt.

Die Reinigung erfolgte an der Chromatographie-Anlage ÄKTA Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode:

Flussrate:	4 ml/min
Äquilibration:	2 CV Laufpuffer ^a
Beladen:	30–500 ml Proteinlösung in Aufschlusspuffer
Waschen:	8 CV Laufpuffer ^a
Eluieren:	15 CV Gradient von 15–750 mM Imidazol mit Elutionspuffer ^b ; es wurden Fraktionen à 2 ml gesammelt.
Reinigung der Säule:	5 CV Elutionspuffer ^b
Äquilibration:	5 CV Laufpuffer ^a
Spülen und Lagerung der Säule:	5 CV H ₂ O; 3 CV 20 % Ethanol

^a: Laufpuffer für sTrpB2i und sTrpB2a: 10 mM KP, pH 7,5 300 mM KCl 10 mM Imidazol; Laufpuffer für sTrpA: 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol; bei Reinigung von Mutanten mit zusätzlichen Cysteinen wurde dem Laufpuffer 1 mM TCEP zugesetzt

^b: Elutionspuffer für sTrpB2i und sTrpB2a: 10 mM KP, pH 7,5 300 mM KCl 1 M Imidazol; Elutionspuffer für sTrpA: 100 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl, 1 M Imidazol; bei Reinigung von Mutanten mit zusätzlichen Cysteinen wurde dem Elutionspuffer 1 mM TCEP zugesetzt

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.5.3). Saubere Fraktionen wurden vereinigt und gegen 5 l 10 mM KP, pH 7,5 dialysiert, wenn das Protein einer weiteren Reinigung über Anionenaustauscherchromatographie (3.4.2.3) unterzogen werden musste. Ansonsten erfolgte die Dialyse gegen 100 mM KP, pH 7,5 (3.4.2.4).

3.4.2.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung von geladenen Molekülen, wobei Proteine mit Salzionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauschermatrix konkurrieren. Zuerst bindet das geladene Molekül an die fixierten Ladungen des Trägermaterials. Im Anschluss daran erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins entweder durch eine steigende Salzkonzentration oder durch die Änderung des pH-Wertes. Die Ladung eines Proteins wird hauptsächlich von den Aminosäuren mit geladenen Seitenketten bestimmt. So sind im sauren und neutralen pH-Bereich die Aminogruppen, überwiegend von Lys, Arg und His, protoniert und das Protein zeigt ein kationisches Verhalten, während im neutralen und basischen Bereich die Carboxylgruppen der Seitenketten von Asp und Glu negative Ladungen tragen und somit das Protein als Anion vorliegt. Die Gesamtladung eines Proteins ist deswegen von der Aminosäurezusammensetzung und vom pH-Wert der umgebenden Lösung abhängig. Bei Trägermaterialien, die selbst positive Ladungen aufweisen und Anionen zu binden

vermögen, spricht man von Anionenaustauschern, während man bei negativ geladenen Trägermaterialien, welche Kationen binden können, von Kationenaustauschern spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den Anionenaustauschersäulen MonoQ 5/50 GL und ResourceQ (GE HEALTHCARE; CV: je 1 ml) gearbeitet.

Die Reinigung wurde an der Chromatographie-Anlage ÄKTA Purifier 10 (GE HEALTHCARE) nach folgender Methode durchgeführt:

Flussrate:	2 ml/min
Äquilibration:	3 CV Laufpuffer ^a
Beladen:	Proteinlösung in 10 mM KP, pH 7,5, bzw. bis zu 5 mg Proteinextrakt in Lysepuffer ^b
Waschen:	10 CV Laufpuffer ^a
Eluieren:	20 CV Gradient von 0-50 % mit Elutionspuffer ^c ; es wurden Fraktionen à 0,5 ml gesammelt.
Reinigung der Säule:	3 CV Elutionspuffer ^c
Äquilibration:	3 CV Laufpuffer ^a
Spülen und Lagerung der Säule:	5 CV H ₂ O; 3 CV 20 % Ethanol

^a: Laufpuffer für sTrpB2i: 10 mM KP, pH 7,5; Laufpuffer für Proteinlysate aus *T. maritima*: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

^b: Lysepuffer für Proteinextrakte aus *T. maritima*: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM DTT, Roche Protease Inhibitor Complete (¹/₅₀ Volumen einer 50 x Stammlösung)

^c: Elutionspuffer für sTrpB2i: 10 mM KP, pH 7,5, 1 M KCl; Elutionspuffer für Proteinlysate aus *T. maritima*: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2 M NaCl

Die Elution der Proteine wurde über die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (3.5.3). Saubere Fraktionen wurden vereinigt, einkonzentriert und über Gelfiltration (3.4.2.5) oder Dialyse (3.4.2.4) in den gewünschten Puffer überführt. Zur Herstellung von vorgereinigten Proteinextrakten aus *T. maritima* und *S. solfataricus* wurde der Gehalt der einzelnen Fraktionen an tmTrpB1, tmTrpB2, sTrpB2i bzw. sTrpB2a über Immunodetektion bestimmt (3.5.6 und 3.5.7), die entsprechenden Fraktionen vereinigt und auf eine Konzentration von ca. 4 mg/ml einkonzentriert. Meist wurde die MonoQ Säule zur Reinigung von sTrpB2i und die ResourceQ Säule zur Vorreinigung von Proteinlysaten aus *T. maritima* verwendet.

3.4.2.4 Dialyse von Proteinlösungen

Falls bei einer Proteinlösung der Puffer gewechselt oder Salze entfernt werden mussten, wurde gegen einen mindestens 100-fachen Volumenüberschuss des gewünschten Puffers bei 4 °C für 4 bis 6 h im Kühlraum dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Visking) mit

einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa verwendet, welcher das Protein zurückhält, während niedermolekulare Substanzen die Membran passieren können.

3.4.2.5 Umpuffern von Proteinlösungen über Gelfiltration

Alternativ zur Dialyse wurden zum Umpuffern von Proteinlösungen auch Entsalzungssäulen (Sephadex G-25, GE Healthcare) verwendet, die auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie beruhen. Wegen des geringen Ausschlussvolumens von 5 kDa können Proteine die Säule ungebremst passieren, während niedermolekulare Substanzen wie Salze oder Pufferbestandteile retardiert werden.

Für geringe Proteinvolumina bis 2,5 ml wurden NAP-5, NAP-10 und NAP-25 Säulen (GE HEALTHCARE) nach Herstellerangaben verwendet, für größere Volumina bis 20 ml, eine selbstgepackte Sephadex G-25 (medium) Säule mit einem Bettvolumen von 125 ml, die an der Chromatographie-Anlage ÄKTA Purifier 10 (GE HEALTHCARE) mit einer Flussrate von 10 ml/min und einem maximalen Rückdruck von 0,9 MPa betrieben wurde.

3.4.2.6 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe der Amicon Zentrifugenröhrchen (Amicon Ultra 4 bzw. 15; molekulare Ausschlussgrenze: 10 kDa oder 30 kDa) über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben (3600 x g, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Volumen des einzukonzentrierenden Proteins.

Zum denaturierenden Einkonzentrieren von Proteinen wurde eine Acetonpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden zu den Proben 4 Vol. Aceton (-20°C) zugegeben und für 2 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 16000 x g, 4°C für 1 h zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 µl 2xSDS Auftragspuffer resuspendiert und für 5 min bei 95° C gekocht.

3.4.2.7 Lagerung von gereinigtem Protein

Die gereinigten und konzentrierten Proteine wurden in flüssigen Stickstoff getropft und bei -80 °C gelagert. Es zeigte sich, dass sTrpB2i schonender gelagert werden konnte, wenn 100 µl Aliquots in Eppendorf Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert wurden.

3.4.3 Markieren von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zur spezifischen Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde in der vorliegenden Arbeit das Cystein-reaktive Fluorophor Alexa Fluor 488 C5 Maleimid (INVITROGEN, Karlsruhe) verwendet (Abbildung 16).

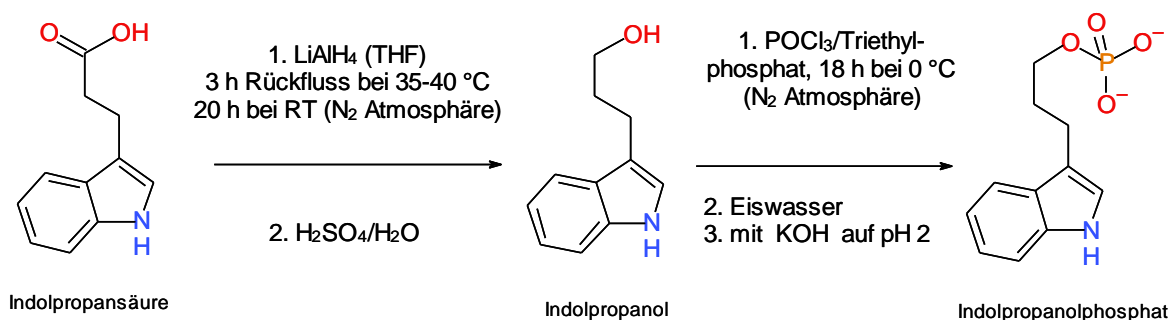


Abbildung 17: Synthese von Indolpropanolphosphat (IPP).

Zur Reduktion von Indolpropansäure zu Indolpropanol (Mamolo et al., 2008) wurden 3 g Indolpropansäure (15,8 ml, Aldrich Nr. 57410) in 80,2 ml wasserfreiem THF unter N_2 Atmosphäre auf Eis gelöst. Es wurden 19,8 ml 2 M LiAlH_4 in THF (Aldrich Nr. 593702) tropfenweise in N_2 Atmosphäre zugegeben. Der Ansatz wurde unter Rückfluss bei 35-40 °C im Ölbad gerührt, anschließend weiter bei RT für 20 h. Die Reaktionsmischung wurde durch einen mit THF angefeuchteten Filter filtriert und durch Zugabe von 50 ml H_2O , dann 50 ml 33% (v/v) H_2SO_4 das restliche LiAlH_4 hydrolysiert. Der Ansatz wurde mit Ethylether ausgeschüttelt und die organische Phase mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und einrotiert. Die Identität und Reinheit des produzierten Indolpropanols wurde über ^1H NMR (Zentrale NMR Analytik der NWF IV der Universität Regensburg) und *reversed phase* HPLC (3.5.11) analysiert.

Zur Herstellung des Endproduktes IPP wurde das Indolpropanol mit Phosphorylchlorid/Triethylphosphat phosphoryliert (Slotin, 1977). Dazu wurden unter Stickstoffatmosphäre 0,2 ml Phosphorylchlorid (Aldrich Nr. 79582) und 5 ml Triethylphosphat (Aldrich 538728) in einem Eiswasserkühlbad mit 0,18 g Indolpropanol vermischt. Der Ansatz wurde 18 h bei 0 °C gerührt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 ml Eiswasser zugegeben und der pH-Wert mit 6 N KOH auf 2 eingestellt. Die Mischung wurde über eine Fritte auf Celite/Aktivkohle adsorbiert und mit 0,5 l Wasser gewaschen. Das Produkt der Reaktion wurde mit 200 ml $\text{EtOH}/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (10:1:9) eluiert, das Eluat einrotiert und der wässrige Rückstand lyophilisiert.

Das schmutzig-weiße Lyophilisat wurde über eine DEAE Sephadex A-25 Anionentauschersäule mit einem Volumen von 12 ml (GE HEALTHCARE) gereinigt. Dazu wurde eine Stufenelution mit den Puffern A (0,2 M NH_4HCO_3) und B (1 M NH_4HCO_3) durchgeführt: 30 ml 100 % A, 30 ml 80 % A, 30 ml 60 % A, 30 ml 50% A. Die Elution des Produktes wurde über die Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Elution von IPP erfolgte quantitativ bei 80 % A. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Reinheit des Produktes wurde über *reversed phase* HPLC

(3.5.11). analysiert und die Identität über Bindungstests an sTrpA und tmTrpA bestätigt (3.5.13.1).

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren UV-Licht in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm. Aus der Aminosäuresequenz kann nach (Pace et al., 1995) der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} (Formel 2) und daraus, unter Einbeziehung des Molekulargewichtes, der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0,1\%}A_{280}$) errechnet werden (Formel 3).

$$\epsilon_{280} = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

Formel 2: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} .

ϵ_{280} molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1}cm^{-1}$]

$$^{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{MW}$$

Formel 3: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$.

$^{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [cm^2/mg]

MW molare Masse des Proteins [g/mol]

Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt werden (Formel 4).

$$A_{280} = ^{0,1\%}A_{280} \cdot c \cdot d$$

$$\rightarrow c = A_{280} / (^{0,1\%}A_{280} \cdot d)$$

Formel 4: Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten $^{0,1\%}A_{280}$.

A_{280} gemessene Absorption bei 280 nm

c Konzentration [mg/ml]

d Schichtdicke der Küvette [cm]

$^{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [cm^2/mg]

Es wurden Spektren von 220–350 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 278 nm befinden sollte. Der Quotient A_{280}/A_{250} sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können. In Tabelle 1 sind die molaren Extinktionskoeffizienten, Molekulargewichte und spezifischen Extinktionskoeffizienten (bezogen auf das jeweilige

Monomer) der in dieser Arbeit verwendeten wildtypischen Proteine und niedermolekularen Substanzen zusammengefasst. Für einzelne Mutanten wurden die entsprechenden Koeffizienten stets neu berechnet.

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten und molare Masse (MW) der verwendeten Proteine und Substrate bzw. Liganden.

Protein /Substrat	Molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{(280)}$ [$M^{-1}cm^{-1}$]	MW [g/mol]	Spezifischer Extinktionskoeffizient $^{0,1\%}A_{280}$ [cm/mg]
tmTrpA	18910	26759	0,71
tmTrpB1 (Monomer)	51925	42917	1,21
tmTrpB2o (Monomer)	37945	46387	0,82
sTrpA	25900	27387	0,95
sTrpB2i (Monomer)	53750	47707	1,13
sTrpB2a (Monomer)	59710	47778	1,25
tmGAPDH (Monomer)	24535	36425	0,67
Tryptophan	5540	204,2	
Indol und Indolderivate	5540		

Die Konzentration aller TrpB Proteine wurde allerdings ausschließlich mit der Bradford Methode (3.5.2) bestimmt, da die hohe Eigenabsorption des gebundenen PLP eine zuverlässige Berechnung von ϵ_{280} verhindert (Leopoldseder et al., 2006).

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Bradford Test dient der quantitativen Bestimmung des Proteingehalts von wässrigen Lösungen. Der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet an Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Die Bindung erfolgt vorwiegend an kationische, nichtpolare und hydrophobe Reste. In einem Bereich von 0,2 - 1,4 mg Protein pro ml Lösung ist die Absorption bei 595 nm annähernd linear. Für den Test wurden 800 μ l verdünnte Proteinlösung mit 200 μ l Biorad-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gemessen, wobei als Referenz die gleiche Menge Reagenz mit Puffer diente. Anhand einer Kalibrierungskurve mit Rinderserumalbumin wurde die Proteinmenge nach folgender Gleichung bestimmt:

$$c = \frac{(A_{595} - b)}{m}$$

c : Proteinkonzentration [mg/ml];

A₅₉₅ : Absorption bei 595 nm

b : y-Achsenabschnitt der Kalibrierungsgeraden

m : Steigung der Kalibrierungsgeraden

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Dabei bindet SDS an das Protein gewöhnlich in einem Verhältnis von einem Molekül SDS pro 1,4 Aminosäureresten. Die Eigenladung des Proteins kann neben der Negativladung des mit SDS komplexierten Proteins vernachlässigt werden, so dass SDS-beladene Proteine identische Ladungs-Masse-Verhältnisse zeigen. Die Auftrennung beruht daher allein auf dem Siebeffekt, wobei die Laufgeschwindigkeit dem Logarithmus der Masse umgekehrt proportional ist (Laemmli, 1970). Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten 12,5 %igen SDS-Gele.

Tabelle 2: Zusammensetzung 12,5 %iger SDS-PAGE Gele.

Die Mengenangaben gelten für 13 Gele.

	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (6 %)
Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	19,5 ml	7,38 ml
Acrylamid-SL (30 %)	26,2 ml	5,9 ml
H₂O	31,58 ml	15,95 ml
TEMED	89 µl	29 µl
APS (10%)	195 µl	89 µl

Die Proben wurden 1:1 mit 2 x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz abzentrifugiert (16000 x g, 30 s). Es wurde je 5–20 µl der Proben in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard diente der Low Molecular Weight Marker (2.4). Die Elektrophorese wurde bei 45 mA und 300 V mit 1 x SDS-PAGE Laufpuffer durchgeführt und dauerte ca. 30 min. Anschließend wurden die Gele mit SDS-PAGE Färbelösung gefärbt, wobei die Nachweisgrenze des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 200–500 ng Protein/mm² beträgt. Die Gele wurden 10 min in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss wurde durch wiederholtes Aufkochen in Wasser (Mikrowelle 900 W) die Hintergrundfärbung entfernt.

3.5.4 Densitometrische Proteinbestimmung mittels SDS-PAGE

Zur Mengenabschätzung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde eine densitometrische Bestimmung mit dem Programm OptiQuant (Version 02.50) durchgeführt. Dazu wurden Kalibrierstandards der zu bestimmenden Proteine (tmTrpA, tmTrpB1, sTrpA, sTrpB2i) von 3 bis 34 pmol pro Geltasche verwendet, da hier ein linearer Zusammenhang zwischen Färbintensität und Menge zu beobachten war. Diese Standards wurden gemeinsam mit den zu quantifizierenden Proben auf einem SDS-Gel getrennt und mit Coomassie für 1 h gefärbt. Die Entfärbung erfolgte, anders als in 3.5.3 beschrieben, mit 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) absoluter Essigsäure, da mit dieser Methode der Hintergrund gleichmäßiger entfärbt wurde. Die Proteinbanden wurden im Anschluss mit der Software OptiQuant quantifiziert, wobei jeweils der Hintergrund des Gels subtrahiert wurde und die Kalibrierstandards zur absoluten Mengenabschätzung dienten.

3.5.5 Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (native PAGE)

Im Vergleich zur SDS-PAGE werden bei der nativen PAGE dem Puffer und dem Gel kein Detergenz zugesetzt, so dass die Proteine nicht denaturiert werden. Daher können mit dieser Methode Protein-Protein Wechselwirkungen nachgewiesen werden, weil Proteinkomplexe erhalten bleiben und diese in der Regel ein anderes Laufverhalten als die isolierten Untereinheiten aufweisen. Die Trennung der Proteine erfolgt bei der nativen PAGE nach Ladung und Masse sowie Form der Proteine bzw. Proteinkomplexe. Da nur negativ geladene Proteine zur Anode wandern, muss der pH-Wert für Gel und Puffer so gewählt werden, dass die eingesetzten Proteine eine negative Gesamtladung haben.

Für den Nachweis des Komplexes aus tmTrpA und tmTrpB1 hat sich hierbei ein pH-Wert von 6,9 als optimal herausgestellt. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Gele.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines Gels für die native PAGE.

50xTAE	0,2 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	2,5 ml
H₂O	7,21 ml
TEMED	0,02 ml
APS (10%)	0,07 ml

Als Laufpuffer diente 1xTAE pH 6,9. Die Proteinproben wurden mit 6x Ladepuffer für die native PAGE (Sucrose Farbmärker 2.15.5) versetzt und je 5 bis 20 µl in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte im Kühlraum bei 4° C bei 150 V, 40 mA für

3,5 h. Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt oder einer Western Blot Analyse unterzogen (3.5.6).

3.5.6 Western Blot

Der Western-Blot dient der spezifischen Identifikation und Quantifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen. Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE werden sie auf eine Membran transferiert, dadurch immobilisiert und mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Der gebundene erste Antikörper und damit das immobilisierte Protein wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine tmTrpB1, tmTrpB2, sTrpB2i und sTrpB2a mittels Western-Blot in Zelllysaten nachgewiesen. Für die Proteine aus *T. maritima* wurden als erste Antikörper spezifische Peptidantikörper verwendet, die in Leopoldseder (2005) und 2.7. beschrieben sind. Für den Nachweis der Proteine aus *S. solfataricus* wurden erneut spezifische Peptidantikörper verwendet, die durch die Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) hergestellt wurden (Sequenzen der zur Immunisierung verwendeten Peptide siehe Kapitel 2.7). Hierbei wurden die Peptide so gewählt, dass die zu 52 % identischen Proteine möglichst spezifisch unterschieden werden können. Außerdem sollten die gewählten Bereiche in beiden Proteinen möglichst oberflächenexponiert liegen, um auch mittels einer nicht-denaturierende Methode wie dem Dot Blot (3.5.7) die Immundetektion durchführen zu können. Als zweiter Antikörper diente Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Meerrettichperoxidase (2.7).

Nach Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE (3.5.3) oder nativer PAGE (3.5.5) erfolgte der Blot auf eine PVDF Membran bei einer Spannung von 300 mA und 150 V für 1 h nach dem *wet blot* Verfahren. Die Membran wurde dazu für 1 min in 100 % Methanol aktiviert und zusammen mit dem fertigen Gel ca. 15 min in Transferpuffer (2.15.4) geschwenkt. Folgender Aufbau wurde für einen Blot verwendet: Anode, 3 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in Transferpuffer getränktes Whatman Papier, PVDF Membran, Gel, 3 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in Transferpuffer getränktes Whatman Papier, Kathode. Der Transfer erfolgte in einer Tankblotapparatur Peqlab 52-WEB-10, als Größenstandard wurde ein vorgefärbter Marker (2.4) verwendet, über den der erfolgreiche Transfer überprüft werden konnte.

Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (2.15.4) inkubiert, um freie Bindestellen zu maskieren, gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungspuffer (1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C, Taumelschüttler). Tabelle 4 zeigt die optimalen Konzentrationen und die Kreuzreaktivitäten der jeweiligen Antikörper.

Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten primären Antikörper im Western Blot.

*Der Antikörper zeigt eine ca. 50-fache Präferenz von sTrpB2i gegenüber sTrpB2a

Antikörper	Optimale Verdünnung	Nachweisgrenze für das Zielprotein	Kreuzreaktivität
Anti-tmTrpB1	1:1000	24 ng	nein
Anti-tmTrpB2	1:7000	12 ng	nein
Anti-sTrpB2i	1:1000	6 ng	ja*
Anti-sTrpB2a	1:20000	12 ng	nein

Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min in je 20 ml PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) erfolgte in 20 ml PBST in einer 1:2000 Verdünnung für 45 min. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal für 10 min in je 20 ml PBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal West Pico Kits (2.8) nach Herstellerangaben. Hierbei oxidiert die an den sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase das im Kit enthaltene Luminol zu 3-Aminophthalat, welches bei 425 nm luminesziert. Diese Lichtsignale wurden durch das Belichten und Entwickeln von Röntgenfilmen (Super RX 100NF, FUJIFILM, Düsseldorf) sichtbar gemacht.

3.5.7 Dot Blot

Der Dot Blot stellt eine einfache Variante des Western Blots dar. Dabei werden die Proben vor der Detektion nicht elektrophoretisch getrennt, sondern direkt auf die PVDF Membran punktförmig aufgebracht.

Dazu wurde die Membran 1 min in Methanol geschwenkt, dann 15 min in Transferpuffer (2.15.4) inkubiert. Anschließend wurde sie auf ein Whatman Papier gebreitet, um leicht anzutrocknen. Es wurden maximal 5 µl Probe aufgetropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Die folgenden Schritte (Blockieren, Primärantikörper, Sekundärantikörper, Detektion) entsprachen denen beim Western Blot. Der Dot Blot zeichnet sich durch geringeren Aufwand und niedrigere Nachweisgrenzen aus. Allerdings zeigte sich, dass der Anti-sTrpB2i Antikörper im Dot Blot aufgrund Kreuzreaktivität mit sTrpB2a nicht verwendbar war (Tabelle 5).

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten primären Antikörper im DotBlot.

* Der Antikörper zeigt keinerlei Selektivität zwischen sTrpB2i und sTrpB2a

Antikörper	Optimale Verdünnung	Nachweisgrenze für das Zielprotein	Kreuzreaktivität
Anti-tmTrpB1	1:1000	3 ng	nein
Anti-tmTrpB2	1:7000	1 ng	nein
Anti-sTrpB2i	1:1000	2 ng	ja*
Anti-sTrpB2a	1:20000	3 ng	nein

3.5.8 Vorbereitung der N-terminalen Sequenzierung

Das zu analysierende Protein wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Dazu wurde wie in 3.5.3 beschrieben vorgegangen, jedoch ein Laufpuffer ohne Glycin verwendet. Anschließend wurde das Protein im *semi dry* Elektrolotverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Western Blotting Membran (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH) übertragen (Towbin et al., 1979). Zur Anfärbung des geblotteten Proteins wurde die Membran für 2 min in die Färbelösung für die N-terminale Sequenzierung gelegt. Danach wurde die Membran in die Entfärbelösung überführt, bis der Hintergrund farblos war. Die Membran wurde an der Luft getrocknet, die interessierenden Banden ausgeschnitten und in der Arbeitsgruppe von Prof. Rainer Deutzmann (Lehrstuhl Biochemie I, Universität Regensburg) sequenziert. Die zyklische Sequenzierung erfolgte vollautomatisch nach der Methode von Edman (Edman & Begg, 1967).

3.5.9 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration lassen sich das apparente Molekulargewicht und somit auch der Oligomerisierungsgrad sowie die Homogenität eines Proteins abschätzen. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Ausschluss-Chromatographie: Die auf die Säule aufgetragenen Moleküle wandern bei konstanter Flussrate durch das poröse Säulenmaterial. Kleine Moleküle wandern aufgrund des für sie größeren Diffusionsraumes langsamer als große Moleküle. Aufgetragene Proteine werden somit der Größe nach aufgetrennt. Mit Hilfe einer Kalibrierungsgerade, die mit Proteinen bekannter Größe erstellt wurde (6.2), konnte das apparente Molekulargewicht (MW_{app}) der analysierten Proteine ermittelt werden, wobei nur bei globulären Analyten ein linearer Zusammenhang zwischen der Elutionsdauer und dem Logarithmus der molaren Masse besteht.

Zur analytischen Gelfiltration von gereinigten Proteinen wurden die Säulen Superdex 75 HR 10/300 GL (GE HEALTHCARE, München) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und TSK GEL 3000 SW (LKB, Bromma, Schweden) bei einer Flussrate von 0,6 ml/min an den Chromatographieanlagen ÄKTA Basic 10 better (GE HEALTHCARE) oder 1200 (AGILENT) verwendet. Zur Chromatographie von löslichen Zellextrakten (3.4.1.3) wurde eine Superose

12 10/300 GL Säule (GE HEALTHCARE, München) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min an der Chromatographie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE HEALTHCARE) verwendet. Um Verschmutzungen der Säule zu vermeiden, wurden dabei nicht mehr als 1 mg Extrakt in maximal 500 µl Volumen auf die Säule injiziert. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Bei der Verwendung der Agilent 1200 HPLC Anlage konnten zur Detektion zusätzlich ein Diodenarray (Aufzeichnung vollständiger Absorptionsspektren) und ein Fluoreszenzdetektor (z.B. zur Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz oder der Fluoreszenz eines extrinsischen Fluorophors) verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Puffer für die analytische Gelfiltration verwendet:

Gelfiltrations-Standardpuffer

50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 300 mM KCl

G3P/Ser Puffer

10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM KCl, 60 mM *rac*-Glycerin-3-Phosphat, 200 mM L-Serin, 0,05 % (w/v) Natriumazid

G3P Puffer

10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM KCl, 60 mM *rac*-Glycerin-3-Phosphat, 0,05 % (w/v) Natriumazid

Ser Puffer

10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 0,05 % (w/v) Natriumazid

Alle Puffer wurden vor Verwendung filtriert (0,22 µm Porengröße) und für 30 min entgast (bzw. an einer Chromatographieanlage mit Online-Entgaser betrieben).

3.5.10 Analytische Ultrazentrifugation

3.5.10.1 Sedimentationsläufe

Mittels analytischer Ultrazentrifugation kann der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden, welcher für jedes Protein, abhängig von seinem Molekulargewicht, seiner Dichte und seiner Form, charakteristisch ist. Dazu wird die Ultrazentrifuge mit hohen Umdrehungszahlen betrieben, wodurch Proteine in den radial ausgerichteten Sektorzellen bis zum Zellenboden wandern. Im Verlauf der Zentrifugation kommt es zur Ausbildung einer Trennlinie (Sedimentationsfront) zwischen reinem Lösungsmittel ohne Makromoleküle und demjenigen Lösungsmittelanteil, in dem noch sedimentierende Proteine enthalten sind. Die Wanderung der Grenzlinie wird in regelmäßigen Zeitabständen über die Messung der Absorption bzw. Fluoreszenzemission in der Sektorzelle verfolgt. Die Wanderungsgeschwindigkeit entspricht

der Sedimentationsgeschwindigkeit, die nach Normierung auf die Zentrifugalbeschleunigung nach Svedberg als Sedimentationskoeffizient s bezeichnet wird (Formel 5).

$$s = \frac{\text{Sedimentationsgeschwindigkeit}}{\text{Zentrifugalbeschleunigung}} = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} [S]$$

Formel 5: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten s .

S	Svedberg Einheit [10^{-13} s]
r	Abstand des Messpunktes zum Rotationszentrum [cm]
t	Zeit [s]
ω :	Winkelgeschwindigkeit ($2\pi \times \text{Upm}/60$) [s^{-1}]

Der Sedimentationskoeffizient hängt vom Molekulargewicht und dem Reibungskoeffizienten f des Makromoleküls ab. Da jedes während der Zentrifugation wandernde Makromolekül eine einzelne Sedimentationsgrenzlinie zeigt, können auch komplexe Mischungen analysiert werden. Bilden in einer Probe zwei Makromoleküle einen Komplex, so ist dieser mit Sicherheit schwerer und wird mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit schneller sedimentieren als jede seiner Einzelkomponenten. Dies bedeutet, dass ein erhöhter Sedimentationskoeffizient den eindeutigen Nachweis für eine Wechselwirkung zwischen den gemischten Makromolekülen liefert (Schubert et al., 2002).

Die einfachste Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten beruht auf der Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit des Wendepunkts der Grenzlinie während der Sedimentation. Obwohl die gleichmäßige Wanderung der Moleküle die Ausbildung einer scharfen Grenzschicht zwischen Lösungsmittel und Lösung erwarten lässt, ist häufig eine Verschmierung dieser Grenzschicht zu erkennen. Grund dafür ist die Diffusion der Teilchen (Lebowitz et al., 2002). Um die s -Werte mehrerer Komponenten in einer solch komplexen Mischung zu extrapolieren bietet sich eine rechnergestützte Auswertung an. Die theoretische Beschreibung der Sedimentation mehrerer Spezies erfolgt durch die Lamm Gleichung (Lamm, 1929) (Formel 6).

$$\frac{\partial \chi(r,t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial \chi(r,t)}{\partial r} - s\omega^2 r^2 \chi(r,t) \right]$$

Formel 6: Lamm-Gleichung zur Behandlung mehrerer sedimentierender Spezies in einem Sedimentationslauf.

χ	Makromolekulare Spezies
r	Abstand des Messpunktes zum Rotationszentrum [cm]
t	Zeit [s]
D	Diffusionskoeffizient $D=RT/(N_A f)$ [$m^2 s^{-1}$] (R : Gaskonstante, N_A : Avogadrozahl, f Reibungskoeffizient)
ω :	Winkelgeschwindigkeit ($2\pi \times \text{Upm}/60$) [s^{-1}]

Die Differentialgleichung beschreibt vollständig die Vorgänge in einer analytischen Ultrazentrifuge unter Berücksichtigung von Diffusionseffekten. Mit dem Programm SedFit (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>) lässt sich durch numerische Integration der

explizit nicht lösbarer Lamm Gleichung, Komponentenanalyse und anschließende Regularisierung der zeitliche Verlauf der Wanderung der Grenzschichten in eine diffusionskorrigierte Sedimentationskoeffizientenverteilung $c(s)$ umwandeln (Lebowitz et al., 2002; Schuck, 2000). Alternativ wurde die dc/dt Methode zur Auswertung von Sedimentationsläufen verwendet (Stafford, 1992). Dazu wurde ein von Dr. Klaus Richter (Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München) geschriebenes Programm verwendet. Dabei werden eng benachbarte *scans* eines Sedimentationsexperiments voneinander subtrahiert, um ein Profil zu erstellen, bei dem die Wanderungsgeschwindigkeit der Laufront (dc/dt) gegen den Radius aufgetragen wird. Basierend auf Formel 5 wird die Radiuskoordinate in s -Werte umgewandelt, wodurch eine Sedimentationskoeffizientenverteilung entsteht, die $g(s^*)$ genannt wird. Allerdings wird hierbei, anders als bei der Lamm-Gleichung, keine Korrektur um Diffusionseffekte durchgeführt, was die Auflösung verringert (Lebowitz et al., 2002).

Die Experimente wurden von Dr. Klaus Richter (Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München) durchgeführt. Für die Sedimentationsläufe wurden die analytische Ultrazentrifuge ProteomoLab XL-A von Beckman mit Fluoreszenzdetektion und dem Rotor Ti-50 verwendet, weshalb die Varianten sTrpA S206C und sTrpA S229C hergestellt und mit dem Fluorophor Alexa 488 markiert wurden (3.4.3). Ein Vorteil der spezifischen Markierung einer Untereinheit (hier sTrpA) bei der Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen ist, dass während des Ultrazentrifugationsexperiments das Verhalten des Komplexes unabhängig von störenden Einflüssen der restlichen Komponenten (z.B. Eigenabsorption von überschüssigem nicht-komplexierten sTrpB2i oder zugesetzter Indolderivate) beobachtet werden kann. Darüber hinaus kann aus den Integralen der Sedimentationskoeffizientenverteilung $c(s)$ direkt der Anteil des komplexierten und nicht-komplexierten, fluoreszenzmarkierten sTrpA abgelesen werden. Da die eingesetzten Konzentrationen aller Proteine bekannt sind, kann über den Zusammenhang $K_D = ([TrpA]_{frei} * [TrpB]_{frei}) / [TrpATrpB]_{Komplex}$ die Dissoziationskonstante K_D des Komplexes berechnet werden. Die Probenzellen wurden mit 300 μ l Proteinlösung beladen, wobei die Konzentration des mit dem Fluorophor Alexa288 markierten Proteins (3.4.3) auf 250-500 nM eingestellt wurde. Die Sedimentationsgeschwindigkeit lag bei 42.000 Upm, und es wurde bei 23 °C für 12 h zentrifugiert.

3.5.10.2 Gleichgewichtsläufe

Die Zentrifugation bei niedrigeren Umdrehungszahlen eröffnet die Möglichkeit, über das Sedimentationsgleichgewicht das Molekulargewicht zu bestimmen. In diesem Fall wurde die Methode des „High-Speed Sedimentation Equilibrium (HSSE)“ verwendet (Yphantis, 1964). Dabei kommt es nach genügend langer Laufzeit zu einem Gleichgewicht zwischen zwei entgegengesetzten Prozessen, der Sedimentation im Zentrifugalfeld und der Rückdiffusion der Teilchen. Analog zum Sedimentationsgeschwindigkeitslauf (3.5.10.1) wird der

Fluoreszenzemissionsverlauf in der Sektorzelle in regelmäßigen Zeitabständen verfolgt. Abbildung 18 zeigt schematisch die Einstellung des Gleichgewichts.

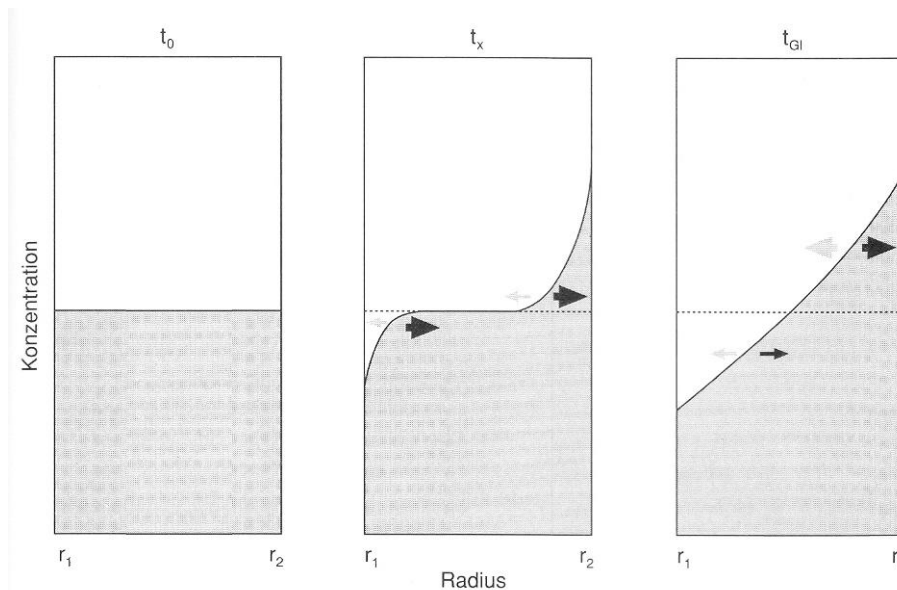


Abbildung 18: Zeitabhängige Änderung des Konzentrationsgradienten im Sedimentationsgleichgewichts-Experiment.

Links: Beginn des Experiments; Mitte: In der ersten Phase sedimentiert gelöstes Material verstärkt zu Boden. Die Sedimentation überwiegt gegenüber der Diffusion (ungleich große Pfeile); Rechts: Das Sedimentationsgleichgewicht ist (annähernd) erreicht (gleich große Pfeile). Abbildung aus Holtzhauer (1996)

Im Gleichgewichtszustand gilt:

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{v} \rho) \omega^2} * \frac{d \ln c}{dr^2} \quad \text{bzw.} \quad \frac{d \ln c}{dr^2} = M * \frac{(1 - \bar{v} \rho) \omega^2}{2RT}$$

Formel 7: Berechnung von M aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen

M	molare Masse [g/mol]
R	allgemeine Gaskonstante=8,31 J*mol ⁻¹ *K ⁻¹
T	absolute Temperatur [K]
c	Konzentration des gelösten Proteins [mg/ml]
ρ	Massendichte des Lösungsmittels [g/ml]
\bar{v}	partielles spezifisches Volumen des Proteins [ml/g]
r	Abstand des Messpunktes zum Rotationszentrum [cm]
ω^2	Winkelgeschwindigkeit (2π x Upm/60) [s ⁻¹]

Das bedeutet, dass eine Auftragung von $\ln c$ gegen r^2 für eine ideale einzelne Spezies im Gleichgewicht eine Steigung ergibt, die proportional zum Molekulargewicht ist.

Die Experimente wurden von Dr. Klaus Richter (Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München) durchgeführt. Für die Gleichgewichtsläufe wurden die analytische Ultrazentrifuge ProteomoLab XL-A von Beckman mit Fluoreszenzdetektion und dem Rotor Ti-50 verwendet. Eine Probenzelle wurde mit 95 µl Proteinlösung beladen und mit 10 µl FC42 Sedimentationsöl überschichtet. Die Konzentration des mit dem Fluorophor Alexa288

markierten Proteins (3.4.3) wurde auf 250-500 nM eingestellt. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit lag zwischen 13.000 und 18.000 Upm, und es wurde bei 4 bzw. 23 °C bis zur Einstellung des Gleichgewichts zentrifugiert.

Die Pufferdichte ρ wurde über die Dichtemessapparatur von Dr. Helmut Durchschlag (Lehrstuhl Biochemie II, Universität Regensburg) bestimmt, das partielle spezifische Volumen \bar{v} mit dem Programm Ultrascan (<http://www.ultrascan.uthscsa.edu/>) aus der jeweiligen Aminosäuresequenz des Proteins berechnet. Die experimentellen Daten der Sedimentationsgleichgewichtsläufe wurden ebenfalls mit diesem Programm ausgewertet. Dabei wurden nach Erreichen des Sedimentationsgleichgewichts 5-10 Fluoreszenzemissionsverläufe mittels eines globalen *fits* an Formel 7, d.h. unter Annahme eines 1-Komponenten Modells, angeglichen und daraus die mittlere molare Masse der Probe ermittelt.

3.5.11 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Bei der HPLC Analytik können die verschiedenen Komponenten eines Reaktionsansatzes oder eines Substanzgemisches mit sehr hoher Empfindlichkeit und Trennschärfe detektiert werden. Dabei werden die Komponenten einer Probe chromatographisch auf einer Säule getrennt und durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessung ein Elutionsprofil des Laufs erstellt. Unterschiedliche Substanzen zeichnen sich durch verschiedene Retentionszeiten aus, über die sie durch den Vergleich mit Standardsubstanzen identifiziert werden können. Je nach den zu trennenden Substanzen werden verschiedene Typen von Säulen und Laufmitteln eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich *reversed phase* Säulen verwendet. Bei diesen handelt es sich um Kieselgele, die mit langen Kohlenwasserstoffketten modifiziert wurden. Dadurch erhält man eine sehr unpolare Oberfläche, an die Substanzen über hydrophobe Wechselwirkungen binden können. Zur Elution wurde eine Gradiententrennung mit einem wässrigen Puffer und einem organischen Lösungsmittel verwendet. Durch Zumischen des organischen Lösungsmittels zur wässrigen Phase sinkt die Polarität des Laufmittels, wodurch seine Elutionskraft steigt. Die an die Säule gebundenen Substanzen eluieren also gemäß ihrer Polarität, wobei sich polare Stoffe vor den unpolaren von der Säule lösen.

Die Analyse von Indolderivaten und anderer hydrophober Metabolite aus Zellextrakten erfolgte durch Auftrennung über eine 3x150 mm Gemini NX-C18-Säule mit 3 μ m Partikelgröße (PHENOMENEX, Aschaffenburg) bzw. einer 3x150 mm Luna-C18(2)-Säule mit 3 μ m Partikelgröße (PHENOMENEX, Aschaffenburg). Dazu wurden folgende Programme verwendet:

Programm 1 für Gesamtextrakte:

Laufmittel A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Millipore-Wasser

Laufmittel B: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril

Flussrate: 0,35 ml/min

Säulentemperatur: 45 °C

Injektionsvolumen: 1-20 µl in Methanol oder Acetonitril

Zeit [min]	% Laufmittel B
0,00	5,0
3,00	5,0
25,80	98,0
29,40	98,0
33,00	5,0

Programm 2 für Extrakte in hydrophoben Lösungsmitteln:

Laufmittel A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Millipore-Wasser

Laufmittel B: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril

Flussrate: 0,35 ml/min

Säulentemperatur: 45 °C

Injektionsvolumen: 1-20 µl in Acetonitril

Zeit [min]	% Laufmittel B
0,00	20,0
3,00	20,0
25,80	98,0
29,40	98,0
33,00	20,0

Programm 3 für präparative Reinigungen:

Laufmittel A: 0,058 % (v/v) TFA in Millipore-Wasser

Laufmittel B: 0,05 % (v/v) TFA in Acetonitril

Flussrate: 0,35 ml/min

Säulentemperatur: 45 °C

Injektionsvolumen: 1-20 µl in Methanol oder Acetonitril

Zeit [min]	% Laufmittel B
0,00	5,0
3,00	5
25,80	98,0
29,40	98,0
33,00	5,0

Die Elution wurde mittels eines Diodenarrays (DAD) in einem Absorptionsbereich zwischen 210 und 500 nm bzw. über die spezifische Indolfluoreszenz ($\lambda_{\text{Ex}}=278 \text{ nm}/\lambda_{\text{Em}}=355 \text{ nm}$) verfolgt.

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz mit Fluorophoren (3.4.3) und der Reinheit von Proteinen wurde eine 2x250 mm Jupiter-C5-Säule mit 5 µm Partikelgröße (PHENOMENEX) verwendet. Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

Programm 4 für Proteinanalytik

Laufmittel A: 0,1 % (w/v) TFA in Millipore-Wasser

Laufmittel B: 0,085 % (w/v) TFA in Acetonitril

Flussrate: 0,2 ml/min

Säulentemperatur: 45 °C

Injektionsvolumen: 1-20 µl in Puffer

Zeit [min]	% Laufmittel B
0,00	5,0
3,00	5,0
50,0	90,0
55,0	5,0

Die Elution wurde mittels des DAD über die Absorption der Peptidbindung bei 210 nm bzw. des Alexa488 Fluorophors bei 495 nm verfolgt. Zusätzlich wurde die Tryptophan Fluoreszenz des Proteins ($\lambda_{Ex}=278$ nm/ $\lambda_{Em}=340$ nm) detektiert.

3.5.12 Massenspektrometrie

LC-ESI-MS (*liquid chromatography electron spray ionisation mass spectrometry*) zur Bestimmung der Gesamtmasse von Proteinen wurde in der Abteilung von Prof. Deutzmann (Lehrstuhl Biochemie I, Universität Regensburg) durch Eduard Hochmuth an einem Finnigan MAT SSQ 7000 Massenspektrometer durchgeführt.

LC-ESI-MS zur Massenbestimmung von niedermolekularen Metaboliten aus Zellextrakten wurde durch Josef Kiermaier (Zentrale Massenanalytik der NWF IV der Universität Regensburg) durchgeführt. Dieser führte auch Fragmentierungsexperimente (LC-ESI-MS-MS) durch, mit deren Hilfe weitere Hinweise auf die Identität der untersuchten Substanzen erhalten werden sollten. In beiden Fällen wurde für die chromatographische Trennung eine Gemini NX C18 Säule mit den Programmen 1 und 2 (3.5.11) verwendet.

3.5.13 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beruht auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wobei in der Regel die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Beide Seitenketten können bei 280 nm angeregt werden, bei 295 nm erfolgt die spezifische Anregung von Tryptophan. Sowohl die Intensität der Fluoreszenzemission als auch die Lage

des Emissionsmaximums hängen stark von der unmittelbaren Umgebung des Chromophors ab. Wenn sich die Umgebung der Fluorophore verändert, z.B. durch Bindung eines Interaktionspartners, kommt es zu Änderungen der Form des Emissionsspektrums (Rotverschiebung/Blauverschiebung bei Änderung der Hydrophobizität der Umgebung) sowie der Quantenausbeute (Schmid, 1997). Daneben kann auch die Eigenfluoreszenz des Liganden selbst (in der vorliegenden Arbeit verschiedene Indolderivate bzw. PLP) als Messsignal verwendet werden, wobei die oben genannten Prinzipien genauso gültig sind.

3.5.13.1 Messung der Ligandenbindung an TrpA

Zur Bestimmung der Affinität von TrpA für fluoreszierende Liganden (z.B. IGP, IPP) wurden bei 25 °C der entsprechende Ligand mit einer Konzentration von 1 µM in 1 ml 50 oder 100 mM HEPES pH 7,5 Puffer in einer 3 ml Fluoreszenzküvette mit Magnetrührer vorgelegt. In die Küvette wurden bis zu 6 µM von tmTrpA ΔW (tryptophanfreie Variante von tmTrpA) bzw. sTrpA ΔW (tryptophanfreie Variante von sTrpA) zutitriert und als Messsignal die Änderung der Eigenfluoreszenz der Indolderivate ($\lambda_{\text{Ex}}=295 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}}=352$ bzw. 376 nm) im Kinetikmodus des Spektrometers verfolgt (Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer: Schlitzbreite 5/5 nm, 700-900 V Verstärkerspannung, 25 °C). Die Auswertung der um die Verdünnung und die Eigenfluoreszenz des zutitrierten Proteins korrigierten Titrationskurven erfolgte durch den Angleich einer quadratischen Gleichung an die Messwerte (Formel 8) (Reinstein et al., 1990).

$$F = F_0 + 0,5 * (F_{\text{max}} - F_0) * \left[1 + \frac{(x + K_D)}{p} - \sqrt{\left(1 + \frac{(x + K_D)}{p}\right)^2 - \frac{4x}{p}} \right]$$

Formel 8: Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz von der zutitrierten Ligandenmenge.

F_0, F_{max}	Fluoreszenz in Abwesenheit des Liganden bzw. bei höchster Ligandenkonzentration
x	Konzentration des zutitrierten Liganden
K_D	Thermodynamische Dissoziationskonstante
p	Konzentration der Bindestellen des vorgelegten Analyten

Dadurch konnte die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden, p entspricht dabei der Konzentration der Bindestellen im vorgelegten Analyten. Lässt man den Parameter p als Variable ebenfalls an die Messpunkte angleichen, so ergibt sich daraus die Stöchiometrie der Interaktion.

Zur Messung der Affinität des nicht-fluoreszierenden TrpA-Liganden GP wurde ein indirekter Ansatz verwendet, bei dem 1 ml einer Mischung aus 2 µM sTrpB2i, 4 µM sTrpA und 200 mM L-Serin in einer 3 ml Fluoreszenzküvette mit Magnetrührer mit 0,5 bis 6 mM *rac* GP titriert wurde. Als Messsignal diente die charakteristische Eigenfluoreszenz der PLP-Serin Addukte im aktiven Zentrum von sTrpB2i, welche empfindlich auf allosterische Liganden an sTrpA reagiert (Goldberg et al., 1968). Nach Anregung bei 440 nm wurde die Emission bei 516 nm verfolgt. Die Änderung der Fluoreszenz wurde im Kinetikmodus des Spektrometers

verfolgt (Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer: Schlitzbreite 5/5 nm, 900 V Verstärkerspannung, 25 °C) wie oben beschrieben mit Formel 8 ausgewertet.

3.5.13.2 Messung von Protein-Protein Interaktionen über die intrinsische Fluoreszenz von TrpB

Zur Bestimmung der Affinität und Stöchiometrie von Komplexen aus TrpA und TrpB wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von TrpB als Messsignal genutzt. Typischerweise wurde TrpB mit einer Konzentration von 1-2 μM in 1 ml 10 mM KP, pH 7,0 100 mM KCl bzw. 50 mM KP, pH 7,5 (mit und ohne entsprechenden Liganden) in einer 3 ml Fluoreszenzküvette mit Magnetprüher vorgelegt. In die Küvette wurden bis zu 3 μM von tmTrpA ΔW bzw. sTrpA ΔW zutitriert, und die Änderung der Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Ex}}=295\text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}}=330$ bzw. 343 nm) im Kinetikmodus des Spektrometers verfolgt (Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer: Schlitzbreite 5/5 nm, 700-900 V Verstärkerspannung, 25 °C) und wie oben beschrieben mit Formel 8 ausgewertet.

3.5.13.3 Messung von Protein-Protein Interaktionen über die PLP Fluoreszenz

Neben den in TrpB enthaltenen Tryptophanen kann, wie bereits unter 3.5.13.1 erwähnt, auch der Cofaktor PLP als Sonde für die Bindung von TrpA an TrpB verwendet werden (Lane et al., 1984). Es ist seit langem bekannt, dass diese das Gleichgewicht zwischen externem Aldimin und Aminoacrylat verschiebt (Abbildung 7). Die beiden letztgenannten Spezies unterscheiden sich deutlich in ihrer Quantenausbeute nach Anregung bei 430 bis 440 nm (Goldberg et al., 1968). Zur Bestimmung der Affinität und Stöchiometrie von Komplexen aus TrpA und TrpB wurde typischerweise TrpB mit einer Konzentration von 1 μM in 1 ml G3P/Ser Puffer (3.5.9) in einer 3 ml Fluoreszenzküvette mit Magnetprüher vorgelegt. In die Küvette wurden bis zu 3 μM von tmTrpA bzw. sTrpA zutitriert und die Änderung der Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Ex}}=430$ bzw 440 nm / $\lambda_{\text{Em}}=507$ bzw. 516 nm) im Kinetikmodus des Spektrometers verfolgt (Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer: Schlitzbreite 5/5 nm, 800 V Verstärkerspannung, 25 °C) und wie oben beschrieben mit Formel 8 ausgewertet.

3.5.14 Isothermische Titrationskalorimetrie

Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine Methode, mit der man Informationen über Protein-Ligand bzw. Protein-Protein Interaktionen durch Messen der Wärmetönung in einem Kalorimeter erhält (Pierce et al., 1999). Das Instrument gleicht durch die Wärmetönung hervorgerufene Temperaturänderungen in der Messzelle im Vergleich zu einer Referenzzelle durch Zufuhr elektrischer Energie aus. Diese stufenweise zugeführte Kompensationsenergie wird in Form von Titrationskurven aufgezeichnet, die mit der beiliegenden ITC Software ausgewertet werden können. Dadurch können die Assoziationskonstante K_A , die

Bindungsenthalpie ΔH und die Stöchiometrie einer Protein-Ligand- bzw. Protein-Protein-Interaktion in einem einzigen Experiment bestimmt werden.

Die Titrationsexperimente in der vorliegenden Arbeit wurden an einem iTC₂₀₀ Gerät (MICROCAL, Freiburg) am Lehrstuhl für Biotechnologie der TU München durchgeführt. Dazu wurden sowohl sTrpA als auch sTrpB2i über Gelfiltration (3.4.2.5) in G3P/Ser Puffer (3.5.9) umgepuffert und anschließend entgast. Die Titration wurde durchgeführt indem bei 20 °C zu 200 μ l 24,6 μ M sTrpB2i aus einer 191,4 μ M sTrpA Lösung in 20 Schritten zu je 2 μ l hinzugegeben wurden. Die Datenanalyse der Titrationskurven wurde mit der ITC-Origin Software (MICROCAL, Freiburg), die dem Gerät beiliegt, ausgeführt, wobei sowohl eine oder auch zwei Bindestellen für den *fit* angenommen wurden.

3.5.15 Steady-state Enzymkinetik

3.5.15.1 Messung der TrpA-Aktivität

Die durch die α -Untereinheit der Tryptophan Synthase katalysierte TrpA-Reaktion ist die reversible aldolytische Spaltung von Indol-3-glycerinphosphat (IGP) zu Indol und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P). Die Messung der Reaktion beruht auf einer NAD⁺ abhängigen Kopplung mit dem Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und wurde wie in Leopoldseder (2005) beschreiben durchgeführt.

3.5.15.2 Messung der TrpB-Aktivität

Die durch die β -Untereinheit der Tryptophan Synthase katalysierte TrpB-Reaktion ist die unter Wasserabspaltung erfolgende Kondensation von Serin und Indol zu Tryptophan. Diese Reaktion ist irreversibel und kann photometrisch über die Zunahme der Absorption bei 290 direkt verfolgt werden ($\Delta\epsilon(\text{Trp-Indol}) = 1.89 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die Messungen wurden wie in Leopoldseder (2005) beschrieben durchgeführt, wobei als Puffer neben 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5 auch 100 mM EPPS pH 7,5 Verwendung fand.

3.5.15.3 Messung der Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase

Die durch den Tryptophan Synthase Komplex katalysierte Gesamtreaktion ist die Umsetzung von IGP und Serin zu GA3-P, Tryptophan und Wasser. Sie setzt sich aus den beiden oben beschriebenen Teilreaktionen zusammen. Die Messung der Reaktion beruht auf demselben Prinzip wie die Messung der TrpA Aktivität (3.5.15.1), da die TrpA-Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist. Die Messungen wurden wie in Leopoldseder (2005) beschrieben durchgeführt.

3.5.16 Genereller kolorimetrischer Nachweis von enzymatischer Desaminaseaktivität

Um Desaminaseaktivität von TrpB mit verschiedenen Substraten testen zu können, ohne jeweils spezielle Hilfsenzyme zu benötigen, wurde ein kolorimetrischer Test verwendet, der spezifisch für Ketogruppen ist (Fujino et al., 2004; Hatfield & Umbarger, 1971). Das gebildete Keton reagiert hierbei mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNHP) zu einem Hydrazon, das bei 600 nm spektroskopisch detektiert werden kann (Abbildung 19).

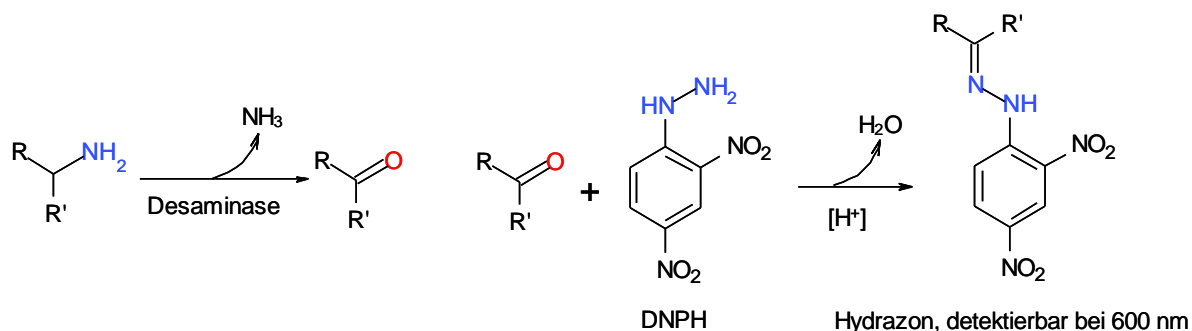


Abbildung 19: Kolorimetrischer Desaminasenachweis nach Hatfield.

DNHP: 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Mit diesem Verfahren wurde die Desaminaseaktivität von je 4 μM tmTrpB1 bzw. tmTrpB2o mit allen L-Aminosäuren als Substrat (Konzentrationen von 1 bis 5 mM) in 50 mM KP, pH 7,5 getestet. Dazu wurden 1 ml Reaktionen nach unterschiedlichen Zeiten mit 0,1 ml 50% Trichloressigsäure abgestoppt. Je 20 μl des Ansatzes wurden mit 180 μl ddH₂O und 0,6 ml 0,0025% (w/v) DNHP in 0,5 N HCl versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden 0,2 ml 40 % (w/v) NaOH zugegeben und der Ansatz im Absorptionsphotometer bei 600 nm vermessen. Als Referenz diente ein in gleicher Weise behandelter Ansatz ohne Enzym.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Transiente Protein-Protein Interaktionen des Tryptophan Synthase Komplexes aus *S. solfataricus*

Die prototypische Tryptophan Synthase ist ein stabiler heterotetramerer $\alpha\beta\alpha$ Komplex. Die entsprechenden TrpA und TrpB1 Untereinheiten, die durch benachbarte Gene des *trp* Operons codiert werden, zeigen eine ausgeprägte allosterische Kommunikation (1.3). Kürzlich wurde eine neue Klasse von TrpB Proteinen, TrpB2, entdeckt. Das Crenarchaeon *S. solfataricus* enthält zwei TrpB2 Proteine, die innerhalb (sTrpB2i) und außerhalb (sTrpB2a) des *trp* Operons codiert werden. Analytische Gelfiltration und Gleichgewichtssedimentationsläufe zeigten, dass weder sTrpB2i noch sTrpB2a einen detektierbaren Komplex mit sTrpA ausbildet. Trotzdem wird sTrpA durch sTrpB2i in *steady-state* enzymkinetischen Messungen bis zu 300-fach aktiviert. Analoge Messungen in Anwesenheit von sTrpB2a zeigten keine messbare Aktivierung von TrpA. Die über Aktivitätstitration bei 65 °C in Anwesenheit von IGP und Serin ermittelte apparente Dissoziationskonstante für den Komplex aus sTrpA und sTrpB2i ist um zwei Größenordnungen höher als bei den TrpA und TrpB1 Proteinen der prototypischen Tryptophan Synthase Komplexen aus *T. maritima* und *E. coli*. Die Interaktion von sTrpA und sTrpB2i zeigt eine starke Substratabhängigkeit, da in Abwesenheit von Serin die apparente Dissoziationskonstante nochmals um den Faktor 100 zunimmt. Daraus wurde geschlossen, dass sTrpB2i transient während der Katalyse mit sTrpA assoziiert, um eine funktionelle Tryptophan Synthase auszubilden. Allerdings konnte dieser Komplex bisher nicht physikalisch nachgewiesen werden. Die folgenden Kapitel beschreiben die Stabilisierung des Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i durch unterschiedliche Liganden und dessen Charakterisierung mit biophysikalischen und zellbiologischen Methoden. Zum Vergleich wurden an verschiedenen Stellen sTrpA, sowie die Proteine aus *T. maritima* tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2o untersucht.

4.1.1 Klonierung, Reinigung und Fluoreszenzmarkierung der benötigten Proteine

Die meisten in dieser Arbeit zur Herstellung rekombinanter Proteine verwendeten Plasmidkonstrukte lagen bereits vor (Tabelle 6). Es ist anzumerken, dass die hier

verwendete Nomenklatur nach Merkl (2007) für die *trpB* Gene aus *S. solfataricus* in früheren biochemischen Arbeiten keine Verwendung fand. So wurden *strpB2i* und *strpB2a* bei Leopoldseder (2005) mit *strpB2a* und *strpB2b* bezeichnet, bei Leopoldseder et al. (2006) dagegen als *strpB2i* und *strpB2o*. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass alle in dieser Arbeit angegebenen Konzentrationen von TrpB Proteinen auf die Monomere bezogen sind.

Tabelle 6: Vorhandene Konstrukte für die Untersuchung der Komplexbildung von sTrpA und sTrpB2i.

Konstrukt	Tag	Quelle
pet28a sTrpA	N-His ₆	Leopoldseder (2005)
pet21a sTrpB2i	C-His ₆	Leopoldseder (2005)
pet28a sTrpB2a	N-His ₆	Leopoldseder (2005)
pet28a tmGAPDH	N-His ₆	Leopoldseder (2005)
pet21a tmTrpA	ohne Tag	Hettwer&Stern (2002)
pet28a tmTrpA W201F (Δ W)	N-His ₆	Schwabe (2007)
pet28a tmTrpB1	N-His ₆	Bolz (2006)
pet21a tmTrpB2	C-His ₆	Bolz (2006)

Für die spezifische Markierung mit dem Cystein-reaktiven Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 C5 Maleimid (3.4.3) wurden in der vorliegenden Arbeit die Konstrukte pet28a sTrpA S206C und pet28a sTrpA S229C erstellt, die für sTrpA Mutanten mit Cysteinaustauschen an zwei unterschiedlichen Positionen und einem N-terminalen His₆-tag codieren. Die Nukleotidaustausche für die Mutationen wurden über Megaprimer PCR (3.3.9.1) in das *strpA* Gen eingeführt. Der jeweilige Megaprimer wurde hierbei mit einem Mutationsprimer, welcher den Austausch beinhaltet (85'sTrpA S206C bzw. 5'sTrpA S229C) und einem genflankierenden Primer (3' T7 Terminator) mittels PCR (3.3.7) amplifiziert, wobei pet28a sTrpA (Leopoldseder, 2005) als Templat diente. Die Vollängen-Gene wurden anschließend mit Hilfe der aus einem Agarosegel aufgereinigten (3.3.5) Megaprimer und des entsprechenden zweiten genflankierenden Primers (5' T7 Promoter) mit Hilfe desselben Templates wie zuvor durch PCR amplifiziert. Mittels der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* wurde das erhaltene mutagenisierte Gen in einen leeren pet28a Vektor kloniert. Nach der Klonierung wurde die Nukleotidabfolge durch Sequenzierung (3.3.10) mit den vektorspezifischen Primern 5' T7 Promoter und 5' T7 Terminator bestätigt.

Für die Durchführung von Fluoreszenztitrationen (3.5.13) wurde die Tryptophan-freie sTrpA Mutante W65F W88F verwendet, welche als sTrpA Δ W bezeichnet wurde. Das entsprechende Konstrukt pet28a sTrpA Δ W, welches zusätzlich für einen His₆ tag am N-Terminus des Proteins codiert, wurde von S. Leopoldseder mittels OE-PCR (3.3.9.2) erstellt (unpublizierte Daten). Dabei wurden im ersten Schritt in getrennten PCR-Ansätzen vom Templat pet28a sTrpA mit den Primerpaaren 5' T7 Promoter und 3'ssTrpA_W65 bzw. 5'ssTrpA_W65 und 3' T7 Terminator zwei überlappende Genfragmente amplifiziert und

mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt (3.3.5). Diese Fragmente dienten in einer zweiten PCR als Matrize, um in Kombination mit den genflankierenden Primern (5' T7 Promoter und 3' T7 Terminator) das vollständige Gen *strpA* W65F zu amplifizieren. Das so erstellte mutagenisierte Gen *strpA* W65F diente in einer einem zweiten, analogen OE-PCR Ansatz mit den Mutageneseprimern 5'ssTrpA_W88 und 3'ssTrpA_W88 als Matrize. Das daraus erhaltene mutagenisierte Gen *strpA* ΔW wurde mittels der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* in einen leeren pet28a Vektor kloniert und die Nukleotidabfolge über Sequenzierung. (3.3.10) mit den vektorspezifischen Primern 5' T7 Promoter und 5' T7 Terminator bestätigt.

Um sTrpB2i auf posttranslationale Modifikationen mit möglichen Auswirkungen auf Aktivität bzw. Komplexbildungsverhalten untersuchen zu können, wurde es auch in seinem natürlichen Wirtsorganismus *S. solfataricus* überexprimiert und aufgereinigt. Dazu wurde ein auf dem auf dem *Sulfolobus* Virus SSV1 basierendes Vektorsystem pMJ05 verwendet, bei dem das Zielprotein unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promoters *araS* steht (Abbildung 14) (Albers et al., 2006b). Die Herstellung des Konstrukts pMJ05 sTrpB2i, das über einen C-terminalen His₆ tag verfügt, erfolgte dabei in zwei Schritten. Zuerst wurde *strpB2i* in den Vektor pMZ1 (Abbildung 13) über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI* umklont, um das Gen mit dem *araS* Promoter zu fusionieren. Aus dem so erstellten Konstrukt pMZ1 *strpB2i* wurde im zweiten Schritt das an den Promoter fusionierte Gen über die Schnittstellen *AvrII* und *EagI* in den Virusvektor pMJ05 umklont.

Für die Herstellung von pMZ1 sTrpB2i mussten zunächst die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* an das *strpB2i* Gen angefügt und eine *BamHI* Schnittstelle entfernt werden. Beides geschah wiederum mittels OE-PCR, wobei für die Erstellung der Genfragmente die genspezifischen Primerpaare ssTrpB2aNcoI_F und ssTrpB2aQCMg81_R bzw. ssTrpB2aQCMg81_F und 3'strpB2i_6xHis_BamHI mit pet21a sTrpB2i als Matrize verwendet wurden. Das Volllängen-Gen wurde anschließend mit Hilfe der aus einem Agarosegel aufgereinigten (3.3.5) Genfragmente und den genspezifischen Primern ssTrpB2aNcoI_F und 3'strpB2i_6xHis_BamHI durch PCR amplifiziert und über die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* in einen leeren pMZ1 Vektor kloniert. Die Integrität des Konstrukts pMZ1 sTrpB2i wurde durch Sequenzierung mit den genflankierenden Primern SP/pMZ1/upstream_avr2 und ASP/pMZ1/downstream_eag1 bestätigt.

Um das Konstrukt pMJ05 sTrpB2i zu erhalten, wurde *strpB2i* gemeinsam mit dem Promoter aus pMZ1 sTrpB2i über die Schnittstellen *AvrII* und *EagI* pMJ05 umklont. Die Reinigung des geschnittenen Vektors mittels präparativer Gelelektrophorese erfolgte mit dem speziell für große DNA Fragmente geeigneten QIAEX II Kit (3.3.5). Aufgrund der Größe und genetischen Instabilität von pMJ05 (Albers et al., 2006b) wurden spezielle *E. coli* ElectroMAX Stbl4 Zellen (2.1) nach Herstellerangaben mit dem Ligationsansatz transformiert. Positive

Transformanten wurden über die Präparation der Plasmid-DNA (3.3.2.1) und anschließenden analytischen Verdau mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *EagI* identifiziert. Das so erhaltene Plasmidkonstrukt pMJ0503 sTrpB2i konnte direkt zur Transformation von *S. solfataricus* verwendet werden (3.2.8 und 4.1.2).

4.1.1.1 Herstellung und Reinigung von sTrpB2a, tmGAPDH, tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2

Die Herstellung und Reinigung von sTrpB2a und des Hilfsenzym tmGAPDH (3.5.15.1) erfolgte nach Leopoldseder (2005), die von tmTrpA nach Hettwer & Sterner (2002), und die von tmTrpB1, tmTrpB2o und des für Fluoreszenztitrationen (3.5.13) verwendeten tmTrpA W201F (=tmTrpA ΔW) nach Bolz (2006) bzw. Schwabe (2007). Im Allgemeinen wurde dabei nach heterologer Expression in *E. coli*, Ernte und Aufschluss der Zellen ein Hitzeschritt mit dem löslichen Extrakt durchgeführt, gefolgt von einer Metallchelate-Affinitätschromatographie und einer Dialyse. Nur tmTrpA wt wurde über Anionenaustauscher- statt Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinheit (Abbildung 20) und die Aktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme entsprachen den publizierten Daten. Die bei sTrpB2a auftretenden zusätzlichen Banden sind auf teilweisen proteolytischen Abbau (nachgewiesen über Immunodetektion mit anti-sTrpB2a Antikörper (3.5.6), Daten nicht gezeigt) zurückzuführen. Der Abbau führte zu keiner Aktivitätsänderung des Enzyms.

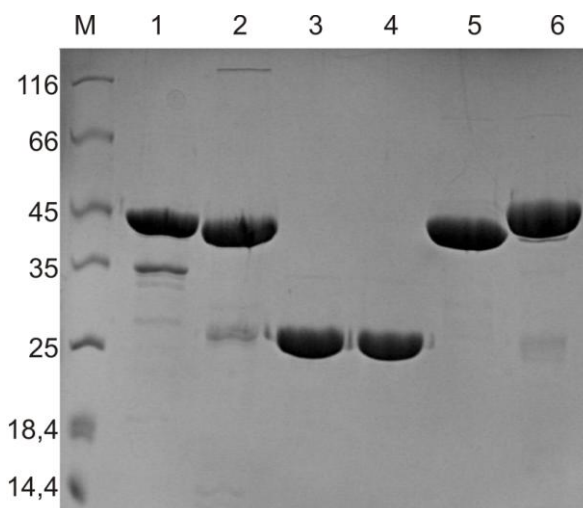


Abbildung 20: SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) zum Nachweis der Reinheit von sTrpB2a (1), tmGAPDH (2), tmTrpA (3), tmTrpA W201F (=tmTrpA ΔW) (4), tmTrpB1 (5) und tmTrpB2 (6). (M) Low Molecular weight marker mit entsprechenden molaren Massen in kDa; es wurden je 10 μ g Protein auf das Gel geladen.

4.1.1.2 Herstellung, Reinigung und Fluoreszenzmarkierung von sTrpA

Zur Herstellung von sTrpA und dessen Varianten wurden BL21(DE3) RIPL Zellen mit dem entsprechenden pet28a sTrpA Konstrukt transformiert (3.2.3), in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol bei 37 °C angezogen und die Genexpression durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert (3.4.1.2).

Abbildung 21 zeigt den Verlauf einer Reinigung von wildtypischem sTrpA, der beispielhaft für alle sTrpA Proteine dieser Arbeit steht.

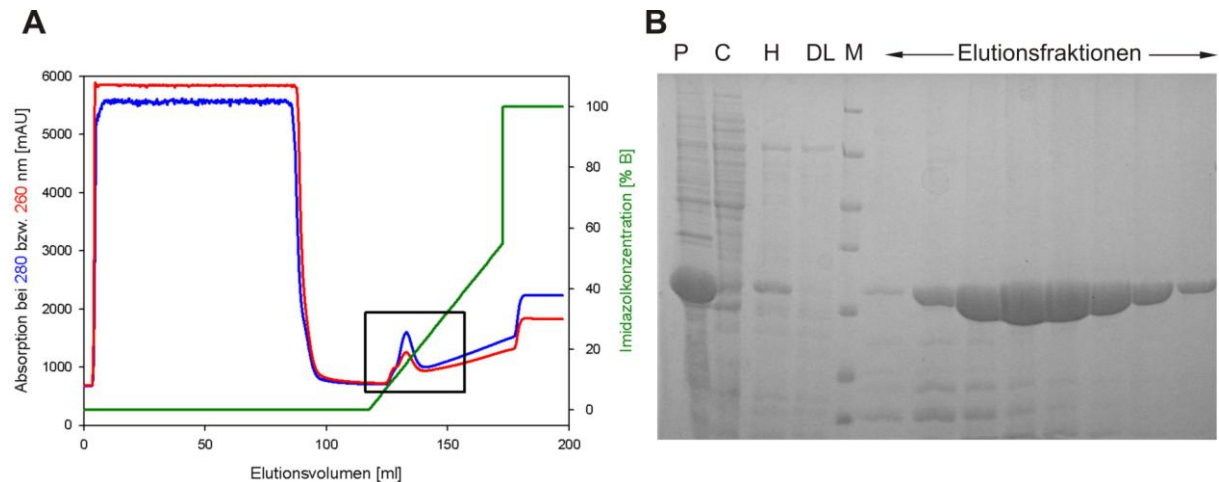


Abbildung 21: Reinigung von sTrpA aus *E. coli* BL21(DE3)RIPL.

A Elutionsprofil der Metallchelate-Affinitätschromatographie, aufgenommen über Absorptionsmessung bei 280 (blau) und 260 nm (rot). **B** Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid). (P) Unlösliche Fraktion des Zellextrakts, (C) lösliche Fraktion des Zellextrakts, (H) Überstand des Hitzeschritts, (DL) Durchlauf fraktion mit nicht mit der Säule interagierendem Protein. (M) Low Molecular weight marker. Die gezeigten Elutionsfraktionen sind in A mit einem schwarzen Rechteck markiert.

Rekombinantes sTrpA fand sich zu über 90 % in der unlöslichen Fraktion des Zellextrakts (P) (Abbildung 21 B). Das in der löslichen Fraktion (C) vorhandene Protein wurde durch einen Hitzeschritt für 20 min bei 75 °C angereichert, wobei ein erheblicher Teil der Wirtsproteine entfernt werden konnte (H). Anschließend wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.4.2.2) durchgeführt (Abbildung 21 A). Fraktionen, die das Protein in reiner Form enthielten (Abbildung 21 B) wurden vereinigt, und mittels Dialyse (3.4.2.4) oder Gelfiltration (3.4.2.5) in 100 mM KP, pH 7,5 umgepuffert. Das umgepufferte Protein wurde auf ca. 100 µM einkonzentriert (3.4.2.6), in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80 °C gelagert. Die Ausbeute betrug ca. 11 mg aus 5 l Expressionskultur, wobei sich die Varianten sTrpA ΔW, sTrpA S206C und sTrpA S229C ähnlich zum Wildtyp verhielten. Abbildung 22 zeigt die Reinheit der verschiedenen sTrpA Proteine.

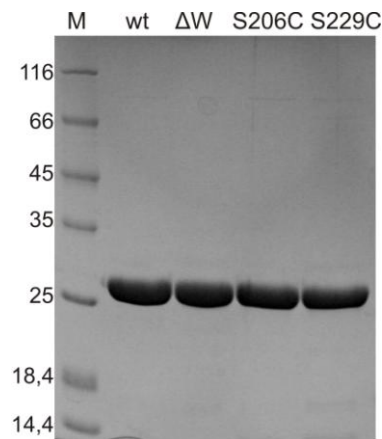


Abbildung 22: SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) zum Nachweis der Reinheit der hergestellten sTrpA Varianten.

(M) Low Molecular weight marker mit entsprechenden molaren Massen in kDa; es wurden je 10 µg Protein auf das Gel geladen.

Die Varianten sTrpA S206C und sTrpA S229C wurden hergestellt, um die Komplexbildung mit sTrpB2i über analytische Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen (4.1.4.1 und 4.1.4.2). Die Position der Austausche wurde dabei so gewählt, dass die eingefügten Cysteine oberflächenexponiert und abseits der putativen sTrpA-sTrpB2i Kontaktfläche liegen, um eine Beeinflussung der Protein-Protein Interaktion durch die Modifikation zu vermeiden (Abbildung 23). Die eingefügten Cysteine wurden mit dem Thiol-reaktiven Fluorophor Alexa Fluor 488 C5 Maleimid modifiziert und die Fluoreszenz-markierten Proteine gereinigt (3.4.3). Da sTrpA über keine weiteren Cysteine verfügt, konnte von einer für diese Position spezifischen Markierung ausgegangen werden.

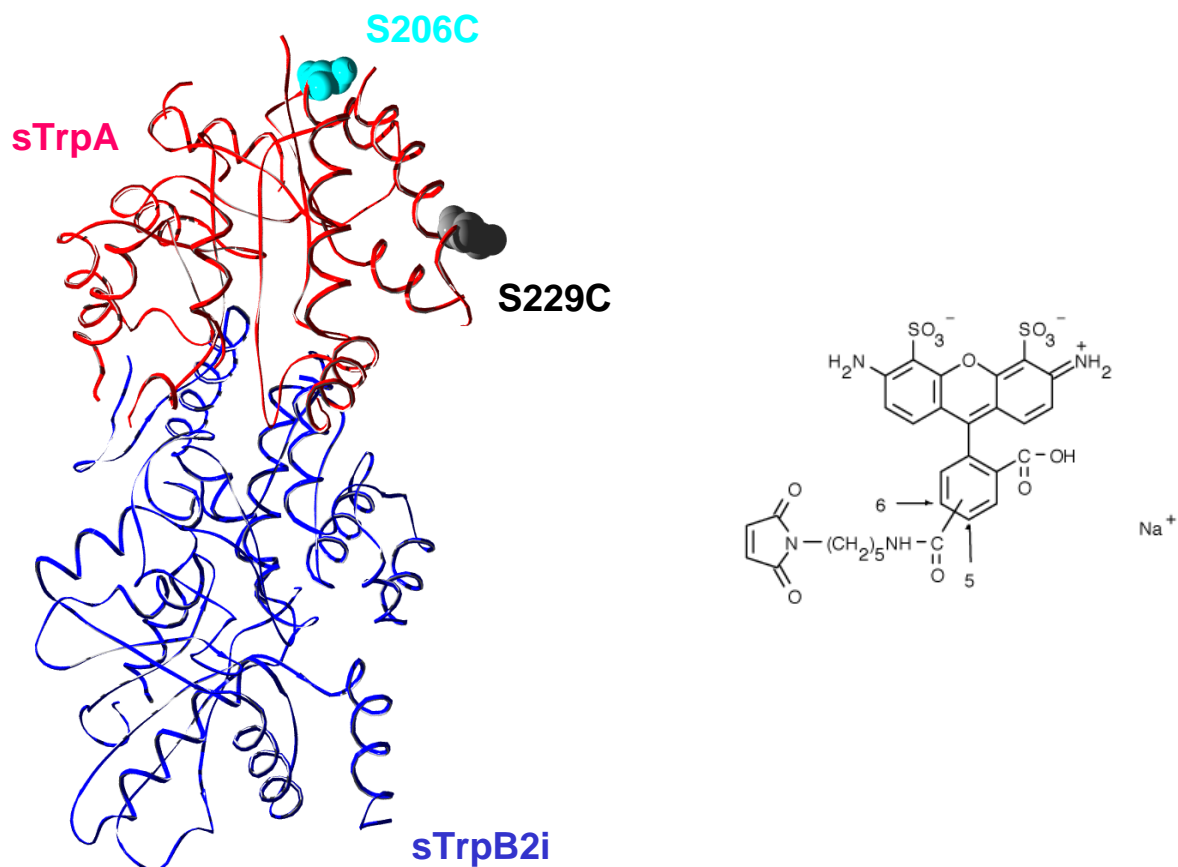


Abbildung 23: Lage der Austausche S206C bzw. S229C im Modell des sTrpA-sTrpB2i Komplexes (links) und Struktur des verwendete Alexa Fluor 488 C5 Maleimid Farbstoffes (rechts).

Das Modell wurde auf Basis der [TrpA-TrpB1]₂ Struktur von *S. typhimurium* (pdb Eintag 1BKS) mit Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>) erstellt.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz und um sicherzustellen, dass kein ungebundener Farbstoff mehr vorhanden ist, welcher die Molekulargewichtsbestimmung bei der analytischen Ultrazentrifugation verfälschen könnte, wurden die markierten Proteine über *reversed phase* HPLC analysiert. Abbildung 24 zeigt das über die Absorption bei 210 nm (Peptidbindung) aufgenommene Elutionsprofil von sTrpA S206C (blau) überlagert mit dem von sTrpA S206C Alexa488 (rot), wobei eine deutliche Erniedrigung der Retentionszeit durch die Markierung erkennbar ist.

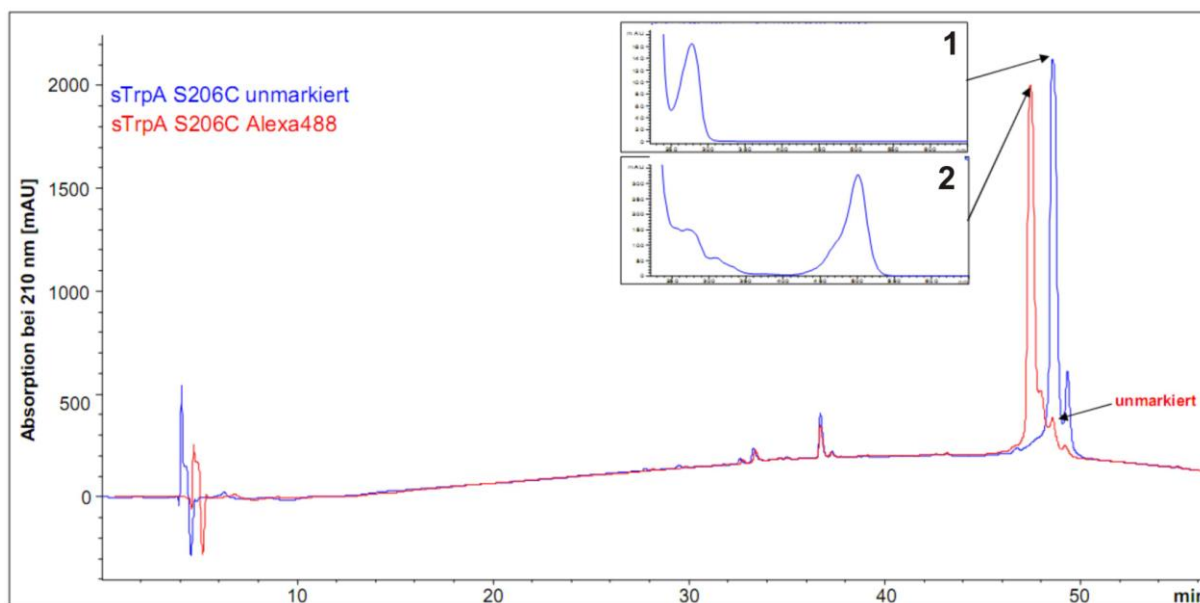


Abbildung 24: Überprüfung der Markierungseffizienz von sTrpA S206C mit dem Fluorophor Alexa488.

Elutionsprofil eines HPLC Laufes mit einer C5-Säule (3.5.11), aufgenommen über die Messung der Absorption bei 210 nm (Peptidbindung). Insets: (1) Absorptionsspektrum des Haupt-peaks des unmarkierten Proteins (2) Absorptionsspektrum des Haupt-peaks der markierten Probe.

Betrachtet man die über den Diodenarray-Detektor zugänglichen und in den beiden Insets gezeigten Absorptionsspektren, so zeigt sich für das unmarkierte Protein (1) ein typisches, durch Tryptophane und Tyrosine geprägtes Absorptionsspektrum. Das Spektrum des markierten Proteins (2) wird dagegen durch den bei 495 nm absorbierenden extrinsischen Fluorophor dominiert. Um auszuschließen, dass in der Probe noch freier Fluorophor vorhanden war, wurde dieser als Referenz einer analogen HPLC-Analyse unterzogen (Daten nicht gezeigt). Bei der entsprechenden Elutionszeit (17 min) konnte in der markierten Probe kein freier Farbstoff nachgewiesen werden. Die Markierungseffizienz des Ansatzes wurde über Vergleich der *peak*-Flächen von markiertem und unmarkiertem Protein bestimmt. Die Effizienz für sTrpA S206C betrug 97%, die in einem analogen Experiment für sTrpA S229C ermittelte Effizienz lag dagegen nur bei 26%. Der Unterschied ist vermutlich auf eine schlechtere Zugänglichkeit des Cysteins an Position 229 für den Fluoreszenzfarbstoff zurückzuführen. Da keines der markierten Proteine ungebundenen Farbstoff enthielt, wurden beide für weitere Experimente verwendet.

4.1.1.3 Herstellung und Reinigung von sTrpB2i

Das Protein sTrpB2i wurde für die vorliegende Arbeit sowohl heterolog in *E. coli*, als auch im natürlichen Wirtsorganismus *S. solfataricus* exprimiert. Das aus *S. solfataricus* gewonnene Protein sollte auf posttranslationale Modifikationen untersucht werden, um dadurch eventuell hervorgerufene Unterschiede im Komplexbildungsverhalten mit sTrpA ausschließen zu können.

Zur Herstellung von sTrpB2i aus *E. coli* wurden BL21(DE3) RIPL Zellen mit dem Konstrukt pet21a sTrpB2i transformiert, in LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol angezogen und die Genexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Da sich nur sehr wenig sTrpB2i in der löslichen Fraktion befand, wurden auch kommerziell erhältliche *fed batch* Verfahren getestet, um die Ausbeute zu erhöhen (3.4.1.1 und 3.4.1.2). Diese Verfahren basieren auf einer kontrollierten enzymatischen Freisetzung von Glucose aus einem Depot, wodurch eine Sauerstofflimitierung und pH-Absenkung des Mediums vermieden wird. Durch diese Verfahren kann nach Herstellerangaben auch in Schüttelkolben eine $OD_{600} > 50$ erreicht werden. Der Hersteller bietet sowohl Minimal- als auch Vollmedien mit gelbasierten Glucosespeichern sowie ein spezielles Vollmedium ohne zusätzlichen Glucosespeicher an. Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurde das Enbase OptiKit im Mikrotiterplattenformat, bei dem diese Medien mit Standard LB-Medium verglichen werden, wie unter (3.4.1.1) beschrieben verwendet, wobei die Menge an löslichem sTrpB2i durch SDS-PAGE nach Metallchelate-Affinitätschromatographie im analytischen Maßstab quantifiziert wurde (Abbildung 25).

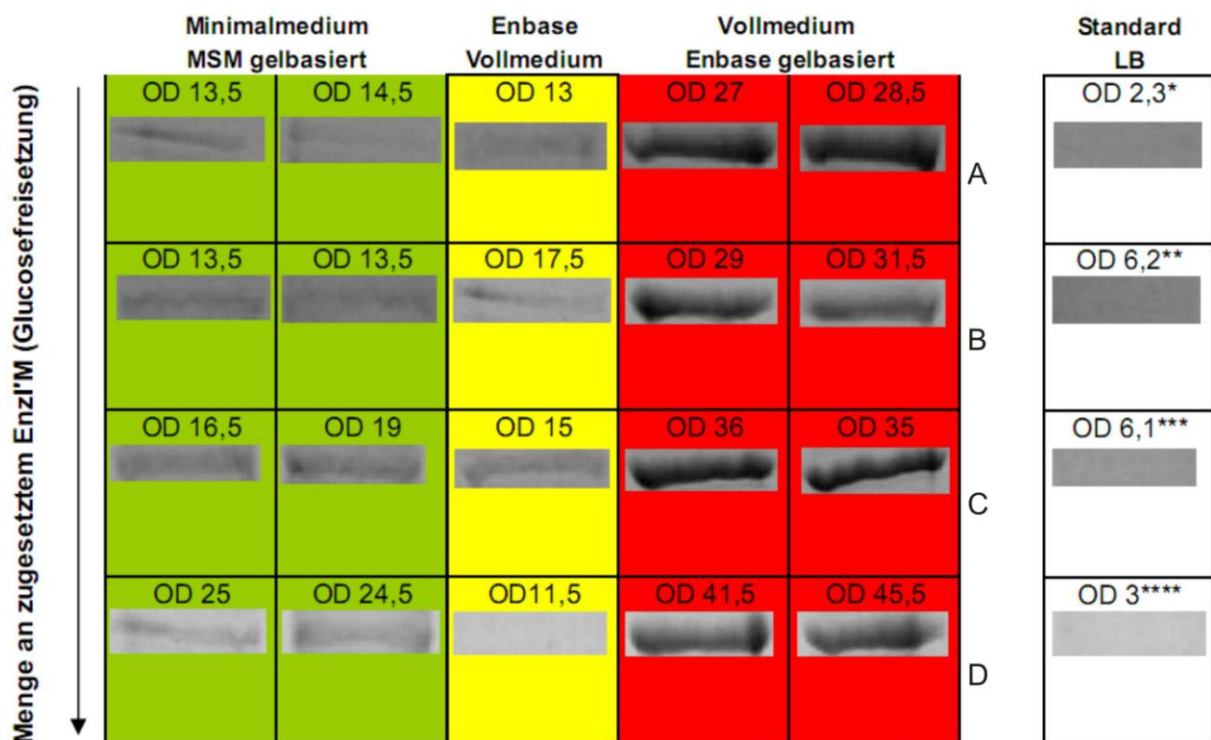


Abbildung 25: Probeexpression von sTrpB2i: Vergleich von *fed batch* (links) mit klassischen *batch* Kultivierungen (rechts).

Die Glucosefreisetzung wurde durch steigende Mengen Enzl'M variiert (A-D, 6, 12, 24 und 48 U/l). Die *fed batch* Ansätze wurden für 48 h kultiviert. Die Quantifizierungen von sTrpB2i erfolgten über SDS-PAGE (12,5% Acrylamid) der löslichen Proteinfraction nach analytischer Metallchelate-Affinitätschromatographie, wobei die erreichten Zelldichten jeweils als OD_{600} angegeben sind. Die gelbasierten Kultivierungen wurden jeweils in Parallelansätzen durchgeführt. (Standard LB: * Ernte nach 7 h Kultivierung, ** nach 18 h, *** nach 24 h, **** nach 48 h. MSM: Mineral Salt Medium).

Die Kulturen in Standard LB Medium zeigten typische OD_{600} -Werte von bis zu 6,1 (nach 24 h). Alle *fed batch* Kulturen wuchsen zu wesentlich höheren Zelldichten heran. Unterschiedliche Mengen an Glucose-freisetzendem Enzym hatten deutliche Effekte im Bezug auf Zellwachstum und Proteinmenge. Laut Abschätzung über SDS-PAGE wurde die größte Ausbeute an löslichem Protein in gelbasiertem Vollmedium mit 6 U/l Enzym erzielt (Reihe A, rot). Das gelbasierte Minimalmedium (grün) und das Enbase Vollmedium ohne Gel (gelb) führten zu geringen Mengen an löslichem Protein, weshalb für die präparative Expression gelbasiertes Vollmedium mit 6 U/l Enzym verwendet wurden.

Zur Expression in größerem Maßstab wurde sowohl das Enbase Shake Flask Kit (Glucose wird über eine Gelmatrix ins Kulturmedium freigesetzt, entsprechend dem Medium in Abbildung 25 rot) als auch das Enbase Flo Kit (Glucose wird aus einem flüssigen Glucosespeicher kontrolliert freigesetzt, dieses Medium ist nicht Teil des Optimierungskits in Abbildung 25) getestet (3.4.1.2) Im gelbasierten Ansatz wurde eine OD_{600} von 30, im Ansatz mit flüssigem Glucosespeicher lediglich eine OD_{600} von 5 erreicht. Der gelbasierte Ansatz erwies sich jedoch insofern als problematisch, dass sich in vielen Fällen das selbst gegossene Gel während der mehrtägigen Kultivierung vom Boden des Schüttelkolben löste und dann aufwändig über Filtration vom Überstand getrennt werden musste.

Um die Ausbeuten der verschiedenen Verfahren quantifizieren zu können, wurde sTrpB2i aus der löslichen Fraktion des Zellextrakts gereinigt (Abbildung 26).

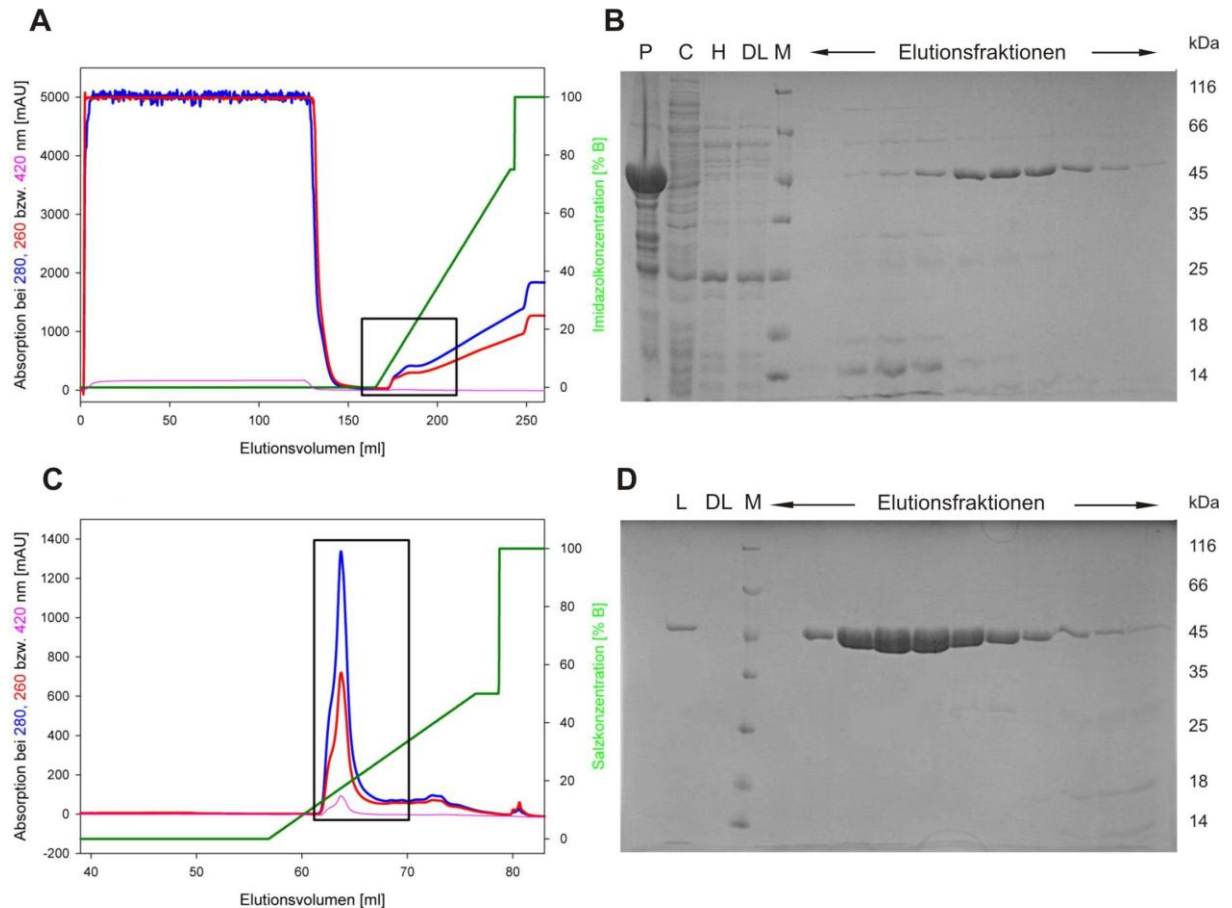


Abbildung 26: Reinigung von sTrpB2i aus *E. coli* BL21(DE3) RIPL.

A Elutionsprofil der Metallchelate-Affinitätschromatographie, aufgenommen über Absorptionsmessung bei 280 (blau), 260 (rot) und 420 nm (pink). **B** Verlauf der Reinigung, verfolgt über SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) (P) Unlösliche Fraktion des Zellextrakts (C) Lösliche Fraktion des Zellextrakts (H) Überstand des Hitzeschritts (DL) Durchlaufraction mit nicht mit der Säule interagierendem Protein. (M) Low Molecular weight marker. Die gezeigten Elutionsfraktionen sind in A. mit einem schwarzen Rechteck markiert. **C** Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie. **D** SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) der Anionenaustauscherchromatographie (L) Vorgereinigtes, dialysiertes Protein, welches auf die Säule gegeben wurde (DL) Durchlaufraction mit nicht mit der Säule interagierendem Protein. (M) Low Molecular weight marker. Die gezeigten Elutionsfraktionen sind in C. mit einem schwarzen Rechteck markiert. Die Absorption von sTrpB2i bei 420 nm beruht auf dem gebundenen Cofaktor PLP.

Rekombinantes sTrpB2i fand sich fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion (P) (Abbildung 26 B). Eine erste Anreicherung des Proteins in der löslichen Fraktion erfolgte über einen Hitzeschritt von 20 min bei 65 °C (H), gefolgt von einer Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.4.2.2) (Abbildung 26 A). Fraktionen, die das Protein in reiner Form enthielten (Abbildung 26 B) wurden vereinigt. Das so vorgereinigte Protein wurde nach einer Dialyse gegen 10 mM KP, pH 7,5 über einen Anionenaustauscher (3.4.2.3) weiter aufgereinigt (Abbildung 26 C und D).

Durch dieses Verfahren konnte sTrpB2i zur vollständigen Homogenität gereinigt werden. Die vereinigten Fraktionen mit sauberem Protein, welches sich nach der Reinigung in 10 mM KP, pH 7,5 und ca. 100 mM KCl gelöst war, wurden direkt auf 30 bis 80 µM einkonzentriert

(3.4.2.6), in 100 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Dabei ergaben sich folgende Ausbeuten für die verschiedenen Expressionsverfahren.

Expression in LB Medium	0,14-0,2 mg/ Liter Expressionskultur
Expression mit Enbase Shake Flask Kit	3,2 mg/ Liter Expressionskultur
Expression mit Enbase Flo Kit	0,8 mg/Liter Expressionskultur

Durch die Verwendung des gelbasierten Enbase Shake Flask Kits konnte somit die Ausbeute an löslichem Protein im Vergleich zu LB-Medium um den Faktor 16 bis 23 erhöht werden. Das auf einem flüssigen Glucosepeicher basierende Enbase Flo Kit erhöhte die Ausbeute um den Faktor 4 bis 6.

Um sTrpB2i auf posttranslationale Modifikationen mit möglichen Auswirkungen auf Aktivität bzw. Komplexbildungsverhalten untersuchen zu können, wurde es auch in seinem natürlichen Wirtsorganismus *S. solfataricus* überexprimiert und aufgereinigt. Dazu wurde ein auf dem *Sulfolobus* Virus SSV1 basierendes Vektorsystem pMJ05 verwendet, bei dem das Zielprotein unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promoters steht (Abbildung 14) (Albers et al., 2006b). Zunächst wurde der Uracil-auxotrophe Stamm PH1-16 mit dem Konstrukt pMJ05 sTrpB2i transformiert (3.2.8) und die Expression bei einer Wachstumstemperatur von 80 °C mit Arabinose induziert. Nach weiterer Kultivierung für 36 h wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen (3.4.1.2). Die Reinigung von nativem sTrpB2i aus der löslichen Fraktion des Zellextrakts erfolgte lediglich durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.4.2.2), während anders als beim rekombinanten Protein kein Hitzeschritt und keine Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt wurden. Die Ausbeute an sauberem sTrpB2i betrug 0,5 mg aus 1 l Expressionsmedium, d. h. es konnte etwa dreimal mehr natives als rekombinantes Protein bei einer Standardexpression in LB Medium gewonnen werden.

4.1.2 Charakterisierung des in *S. solfataricus* exprimierten sTrpB2i

Proteine können auf verschiedenste Weisen posttranslational modifiziert werden. So können verschiedene Moleküle kovalent mit dem Protein verbunden werden, es können sich intra- und intermolekulare Verknüpfungen ausbilden oder es findet eine proteolytische Prozessierung der Polypeptidkette statt. Beispiele für kovalente Modifikationen sind etwa Glycosylierungen, Lipidanhänge, Phosphorylierungen oder Methylierungen. Die kovalente Verknüpfung zweier Cysteinreste zu einer Disulfidbrücke verändert nicht nur die dreidimensionale Struktur einer Polypeptidkette, sondern kann auch zur Aufrechterhaltung

eines bestimmten Oligomerisierungszustands dienen. Die proteolytische Prozessierung neu synthetisierter Polypeptidketten erlaubt eine Kontrolle der Faltung und Funktion eines Proteins. Posttranslationale Modifikationen stellen somit ein wichtiges Instrument dar, um die biologischen und physiko-chemischen Eigenschaften eines Proteins zu kontrollieren. Neben der seit langen bekannten Verbreitung in *Eukarya* und *Bacteria*, häufen sich die Beispiele für posttranslationale Modifikationen auch in *Archaea* (Eichler & Adams, 2005). Der in dieser Arbeit verwendete Organismus *S. solfataricus* ist diesbezüglich schon gut untersucht. So wurden Glycosylierungen z. B. in membranassoziierten, zuckerbindenden Proteinen (Elferink et al., 2001) oder einer membranassoziierten Serin/Threonin Kinase nachgewiesen (Lower & Kennelly, 2002). Ebenso gezeigt wurden Phosphorylierungen von Komponenten von Signaltransduktionskaskaden (Lower et al., 2000; Lower et al., 2004), der DNA Replikation (De Felice et al., 2003; Grabowski & Kelman, 2001) oder einer Zink-abhängigen Amino-peptidase (Condo et al., 1998). Daneben treten auch Methylierungen bei einer Vielzahl von Proteinen auf, wobei zwischen den reversiblen O-Methylierungen von Carboxylgruppen und den irreversiblen N-Methylierungen von N-terminalen oder Seitenketten-Stickstoffen unterschieden werden kann. In *S. solfataricus* wurden methylierte Lysine nachgewiesen, z. B. bei der Glutamat Dehydrogenase (Maras et al., 1992), der Aspartat Aminotransferase (Zappacosta et al., 1994) und der β -Glycosidase (Febbraio et al., 2004). Bei der β -Glycosidase wurde ein Zusammenhang zwischen der N- ϵ -Methylierung spezifischer Lysine und erhöhter thermischer und chemischer Stabilität des Enzyms im Vergleich zum nicht-methylierten rekombinanten Protein gefunden. Überraschenderweise hat die biochemische und strukturelle Charakterisierung vieler archaeeller cytoplasmatischer Proteine gezeigt, dass diese Disulfidbrücken aufweisen. So wird die bei der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *S. solfataricus* vorhandene Disulfidbrücke mit erhöhter thermischer Stabilität assoziiert (Isupov et al., 1999). Bemerkenswerterweise werden cytosolische Disulfidbrücken in *S. solfataricus* auch dazu genutzt, den Oligomerisierungszustand von Proteinen zu stabilisieren, so z. B. bei der dimeren Glycosyltrehalose Trehalohydrolase (Feese et al., 2000) oder der hexameren 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosine Phosphorylase (Appleby et al., 2001; Cacciapuoti et al., 1994). In *S. solfataricus* wurden weiterhin verschiedene Signalsequenzen zur spezifischen proteolytischen Prozessierung nachgewiesen. Es sind 4 verschiedene Klassen von Signalsequenzen bekannt und 4,2% des Proteoms besteht aus putativen sekretorischen Proteinen (Albers & Driessen, 2002). Auch Acetylierung von Lysinresten wurde als Modifikation von Proteinen aus *S. solfataricus* beschrieben und zwar für das DNA-bindende Alba Protein, welches durch Acetylierung seine Affinität gegenüber DNA verringert (Bell et al., 2002).

Das ungewöhnliche Komplexbildungsverhalten der rekombinanten sTrpB2i und sTrpA Proteine (Leopoldseder et al., 2006) könnte möglicherweise auf das Fehlen einer

posttranslationalen Modifikation zurückgehen. Zur Identifizierung einer möglichen derartigen Modifikation wurde in der vorliegenden Arbeit das direkt aus *S. solfataricus* gereinigte sTrpB2i über Massenspektrometrie (3.5.12) und N-terminale Sequenzierung (3.5.8) untersucht. Die N-terminale Sequenz der rekombinanten und nativen Proteine ist identisch (VKEDI). Sowohl in *E. coli* als auch in *S. solfataricus* wird somit das N-terminale Methionin durch Methionin-Aminopeptidasen entfernt, was ein häufig auftretendes Phänomen ist (Bradshaw et al., 1998). Durch diesen Befund kann eine N-terminale proteolytische Modifikation ausgeschlossen werden. Auch der Massenvergleich zeigt, dass die beiden Proteine im Rahmen der Messgenauigkeit identisch sind (rekombinantes sTrpB2i aus *E. coli*: 48398,6 \pm 48 Da; sTrpB2i aus *S. solfataricus*: 48436,3 \pm 48 Da). Somit können Glycosylierungen, Phosphorylierungen und wohl auch Acetylierungen des Enzyms in *S. solfataricus* ausgeschlossen werden. Lediglich eine bis vier Methylierungen von Lysinresten würden bei diesem Messverfahren unentdeckt bleiben.

Durch *steady-state* enzymkinetisch Messungen bei 60 °C (3.5.15.2) erhaltene Sättigungskurven (nicht gezeigt) ergaben, dass die TrpB-Aktivität des aus *S. solfataricus* gereinigten sTrpB2i mit einem k_{cat} von 0,1 s⁻¹ und einem $K_{\text{M}}^{\text{Ser}}$ von 130 mM der des rekombinanten Proteins recht ähnlich ist (k_{cat} =0,2 s⁻¹, $K_{\text{M}}^{\text{Ser}}$ =35 mM, Leopoldseder et al., 2006). Auch war ebenso wie für rekombinantes sTrpB2i (Leopoldseder et al., 2006), mit sTrpB2i aus *S. solfataricus* eine Komplexbildung mit sTrpA mittels Gelfiltration nicht detektierbar (Abbildung 27).

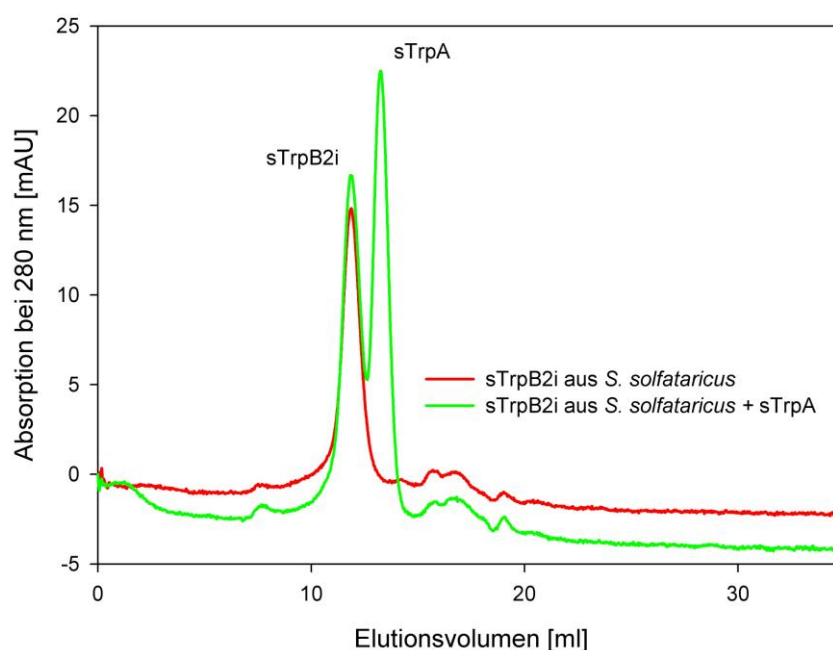


Abbildung 27: Analyse der Komplexbildung zwischen aus *S. solfataricus* gereinigtem sTrpB2i und rekombinantem sTrpA über analytische Gelfiltration.

Elutionsprofil von 6 μ M sTrpB2i aus *S. solfataricus* (rot) und nach Mischung mit 12 μ M heterolog exprimiertem sTrpA (grün). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min in 50 mM

KP Puffer, pH 7.5, 300 mM KCl auf einer Superdex 75 HR 10/300 GL Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das aus *S. solfataricus* gewonnene sTrpB2i weder durch seine molare Masse noch durch seine katalytische Aktivität oder sein Komplexbildungsverhalten von heterolog exprimiertem sTrpB2i zu unterscheiden ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass die fehlende hochaffine Bindung von sTrpB2i an sTrpA eine andere, noch zu untersuchende Ursache hat. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass natives sTrpA signifikante Unterschiede zum heterolog exprimierten Protein zeigt. Dies sollte in Zukunft durch seine Reinigung aus *S. solfataricus* und Charakterisierung näher untersucht werden.

4.1.3 Allosterische Kommunikation zwischen den aktiven Zentrum von sTrpA und sTrpB2i

Bei den kanonischen Tryptophan Synthasen aus mesophilen Bakterien und *T. maritima* führt die Assoziation der TrpA und TrpB1 Untereinheiten zu einer ausgeprägten allosterischen Kommunikation zwischen den aktiven Zentren (Pan et al., 1997), die sich an Hand der in Abbildung 28 gezeigten Reaktionsschemata der α - und β -Reaktionen veranschaulichen lässt.

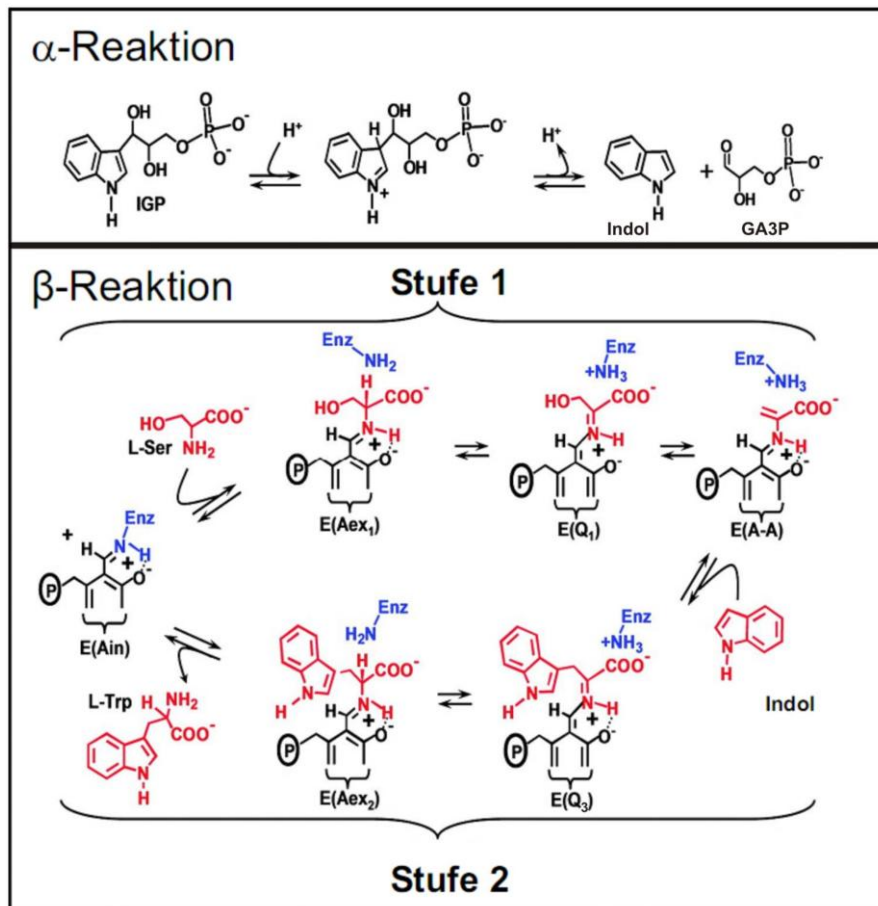


Abbildung 28: Reaktionsschema der Tryptophan Synthase.

Gezeigt sind die α - und β -Teilreaktionen. E(Ain): internes Aldimin, E(Q): Quinoidintermediat E(A-A): Aminoacrylat. Das Bild wurde nach Dierkers et al. (2009) modifiziert.

In Stufe 1 der β -Reaktion reagiert Serin mit dem als internen Aldimin E(Ain) vorliegenden PLP zum externen Aldimin E(Aex₁), welches über das Quinoidintermediat E(Q₁) schließlich die Schiff'sche Base des α -Aminoacrylats E(A-A) bildet. In Stufe 2 greift das von der α -Untereinheit gebildete Indol nucleophil E(A-A) an, um über die Quinoidintermediate E(Q₂) (nicht gezeigt) und E(Q₃) schließlich zum externen Aldimin des Tryptophan E(Aex₂) zu reagieren. Dieses wird schließlich freigesetzt und das interne Aldimin E(Ain) regeneriert. Die einzelnen Schritte der β -Reaktion sind reversibel, wobei die Gleichgewichte durch allosterische Liganden und monovalente Kationen beeinflusst werden können (Fan et al., 2000). So verschiebt etwa die Bindung verschiedener TrpA-Liganden das Gleichgewicht zwischen E(Aex₁) und E(A-A) zugunsten des E(A-A) Intermediats (Ngo et al., 2007). Auch die Bindung von TrpA an TrpB Dimer, hat den selben Effekt (Jhee et al., 1998). Der Übergang von E(Aex₁) zu E(A-A) kann spektroskopisch verfolgt werden, wobei im Tryptophan Synthase Komplex aus *S. typhimurium* E(Aex₁) ein Absorptionsmaximum bei 424 nm, E(A-A) dagegen ein Maximum bei 340 nm aufweist (Jhee et al., 1998).

Als Referenzprotein für einen kanonischen $\alpha\beta\beta\alpha$ Tryptophan Synthase Komplex wurden in der vorliegenden Arbeit die tmTrpA und tmTrpB1 Enzyme aus *T. maritima* verwendet (Hettwer & Sterner, 2002). Die PLP-Addukte im aktiven Zentrum von tmTrpB1 zeigten dabei

sehr ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie die von TrpB1 aus *S. typhimurium* (Abbildung 29).

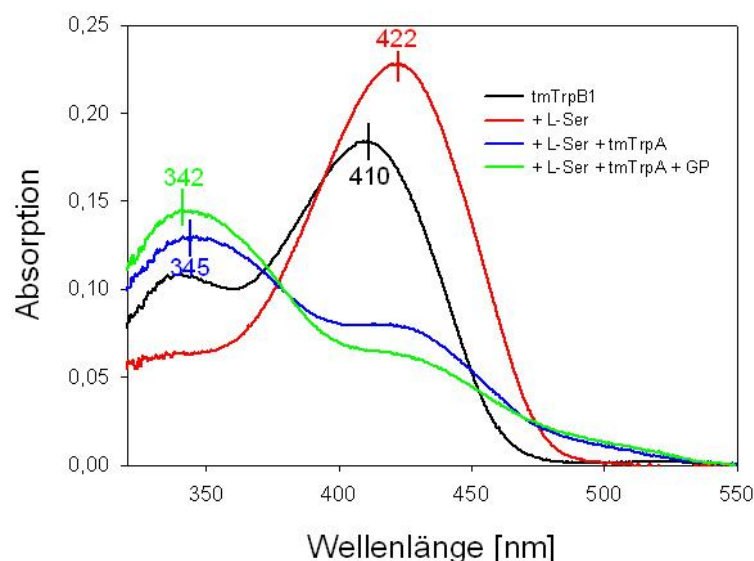


Abbildung 29: Effekt von tmTrpA und Liganden auf das Absorptionsspektrum der PLP-Addukte von tmTrpB1.

Absorptionsspektren von 30 μM tmTrpB1 (schwarz), 30 μM tmTrpB1+200 mM L-Ser (rot), 30 μM tmTrpB1+200 mM L-Ser+40 μM tmTrpA (blau), 30 μM tmTrpB1+200 mM L-Ser+40 μM tmTrpA+60 mM *rac* GP (grün). Die Messungen wurden bei 25 °C in 50 mM KP, pH 7,5 durchgeführt. Die gezeigten Spektren sind um die Verdünnung korrigiert, das Absorptionsmaximum ist jeweils angegeben.

Durch Zugabe von Serin zu tmTrpB1 verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 410 auf 422 nm, wie bei Bildung von $\text{E}(\text{Aex}_1)$ zu erwarten. In Anwesenheit von Serin und tmTrpA ähnelt das gemessene Spektrum mit einem Maximum von 345 nm dem der *S. typhimurium* Tryptophan Synthase im Zustand $\text{E}(\text{A-A})$ (Peracchi et al., 1996). Durch Zugabe des TrpA-Liganden Glycerin-3-Phosphat (GP) wird das Gleichgewicht wie bei *S. typhimurium* Tryptophan Synthase weiter Richtung $\text{E}(\text{A-A})$ verschoben. Höhere Konzentrationen an Serin, tmTrpA oder GP veränderten die gemessenen Spektren nicht mehr, weshalb davon ausgegangen wurde, dass alle Liganden in Sättigung vorlagen.

Bei der Durchführung des analogen Experiments mit sTrpB2i ergab sich ein anderes Bild (Abbildung 30).

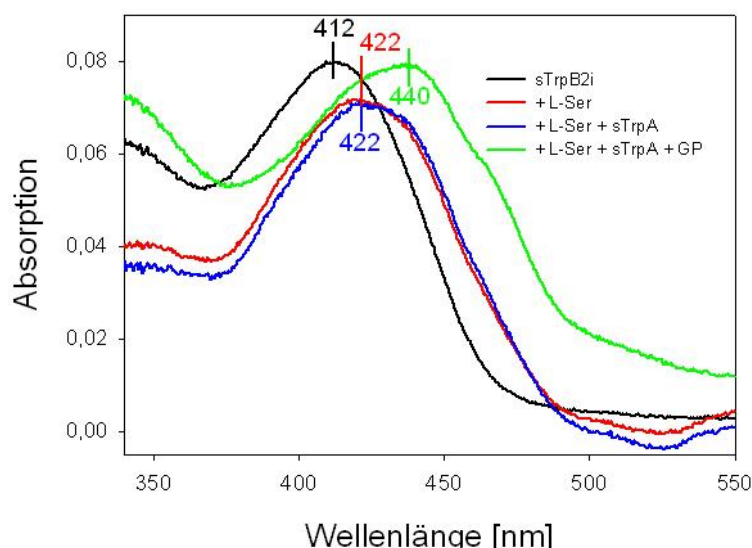


Abbildung 30: Effekt von sTrpA und Liganden auf das Absorptionsspektrum der PLP-Addukte von sTrpB2i.

Absorptionsspektren von 17 μM sTrpB2i (schwarz), 17 μM tmTrpB1+200 mM L-Ser (rot), 17 μM sTrpB2i+200 mM L-Ser+25 μM sTrpA (blau) 17 μM sTrpB2i+200 mM L-Ser+25 μM sTrpA+60 mM *rac* GP (grün). Die Messungen wurden bei 25 °C in 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl durchgeführt. Die gezeigten Spektren sind um die Verdünnung korrigiert, das Absorptionsmaximum ist jeweils angegeben.

Die Zugabe von Serin zu sTrpB2i führte auch hier zu einer Maximumverschiebung von 412 auf 422 nm, d. h. $E(\text{Aex}_1)$ wird ebenfalls gebildet. Allerdings bewirkte die Zugabe von sTrpA keine Veränderung des Spektrums. Dagegen induzierte der TrpA-Ligand GP eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 440 nm und die Erhöhung der Absorption unterhalb von 350 nm. Zugaben höherer Konzentrationen an Serin, sTrpA oder GP veränderten die gemessenen Spektren nicht mehr, weshalb davon ausgegangen wurde, dass alle Liganden in Sättigung vorlagen. Das Absorptionsspektrum von sTrpB2i in Anwesenheit von sTrpA, Serin und GP kann wegen des fehlenden TrpB-Substrates Indol nicht durch die Bildung von $E(\text{Q}_2)$ bzw. $E(\text{Q}_3)$ erklärt werden. Unter der Annahme gleicher enzymatischer Mechanismen der Tryptophan Synthasen aus *T. maritima* und *S. solfataricus* muss es sich bei der beobachteten Spezies um $E(\text{Q}_1)$, $E(\text{A-A})$ oder einem Gleichgewicht zwischen den beiden Intermediaten handeln. Die fehlende allosterische Interaktion zwischen sTrpA und sTrpB2i in Abwesenheit von GP deckt sich mit den Befunden von Leopoldseder et al. (2006) und aus dieser Arbeit, nach denen unter diesen Bedingungen keine messbare Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2i erkennbar war (Abbildung 27). Abbildung 30 belegt, dass jedoch durch die Bindung des TrpA-Liganden Glycerin-3-phosphat das PLP-Addukt von sTrpB2i verändert wird, d. h. eine allosterische Interaktion zwischen den aktiven Zentren der beiden Proteine stattfindet. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sTrpA und sTrpB2i nach Bindung der Liganden GP und Serin an beiden aktiven Zentren einen physikalischen Komplex bilden.

4.1.4 Stabilisierung, Stöchiometrie und Quartärstruktur des Komplexes

4.1.4.1 Induktion der Komplexbildung durch Substrat-, Übergangszustands- und Produktanaloga

Die Befunde aus Kapitel 4.1.3 wurden zum Anlass genommen, die Komplexbildungseigenschaften von sTrpA und sTrpB2i in Anwesenheit verschiedener Liganden zu untersuchen. Zunächst wurde eine analytische Gelfiltration von sTrpA, sTrpB2i und deren Mischung in Anwesenheit von GP und Serin durchgeführt (Abbildung 31).

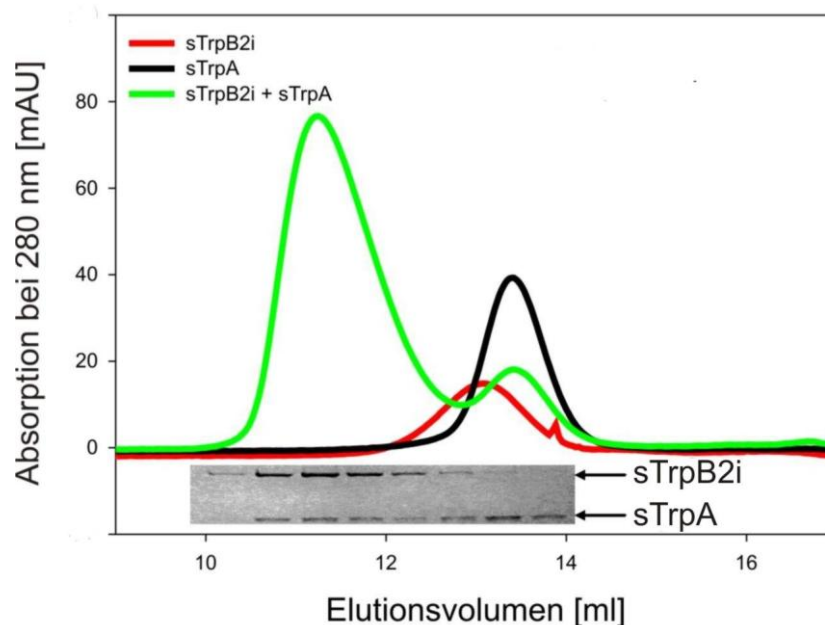


Abbildung 31: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA in Anwesenheit von Serin und GP.

Elutionsprofil von 5,1 μM sTrpB2i (rot), von 16,5 μM sTrpA (schwarz) und von 10,9 μM sTrpB2i mit 17,3 μM sTrpA (grün). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min in 10 mM KP Puffer, pH 7,0, 100 mM KCl, 60 mM *rac* GP, 200 mM L-Serin, 0,05 % Natriumazid auf einer Superdex 75 HR 10/300 GL Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Während der Elution des Proteingemisches wurden Fraktionen gesammelt, deren Zusammensetzung über SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) analysiert wurde. Das Gel der jeweiligen Fraktionen ist an entsprechender Stelle im Elutionsprofil eingefügt.

Sowohl sTrpA als auch sTrpB2i eluieren als homogene *peaks*. Die Zugabe eines Überschusses an sTrpA zu sTrpB2i ergibt einen deutlich früher eluierenden *peak*. Die Analyse mittels SDS-PAGE belegte, dass letzterer sowohl sTrpB2i als auch sTrpA enthielt und somit einen Komplex aus den beiden Proteinen darstellt (Abbildung 31). Da keine Kalibrierung mit Eichproteinen (2.8) im entsprechenden Laufpuffer durchgeführt wurde, wird an dieser Stelle auf die Angabe von apparenten Molekulargewichten verzichtet. Die exakten Molekulargewichte der freien und komplexierten Proteine in Anwesenheit der Liganden wurden zu einem späteren Zeitpunkt über analytische Ultrazentrifugation ermittelt (Abbildung 50).

Die Frage, ob die Anwesenheit eines einzelnen Liganden, GP oder Serin, bereits ausreicht, um die Komplexbildung zu initiieren, wurde wiederum über analytische Gelfiltration untersucht (Abbildung 32).

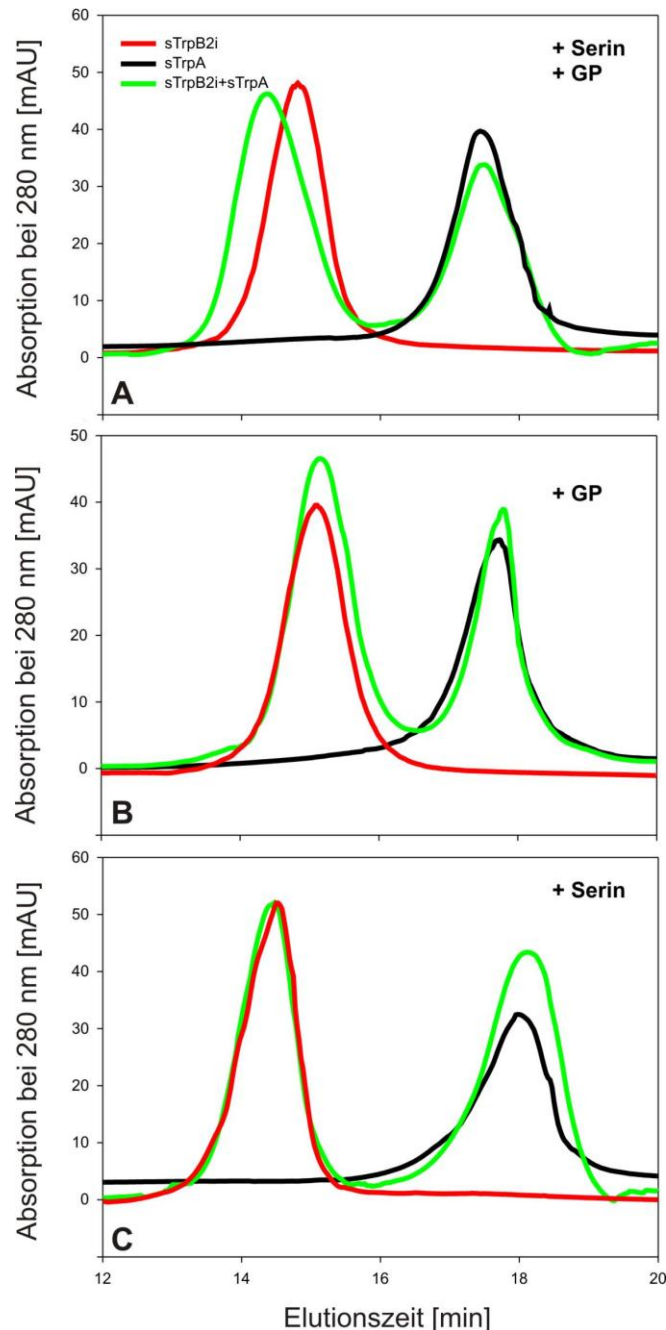


Abbildung 32: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA in Anwesenheit von Serin oder GP.

Elutionsprofile von 10 μ M sTrpB2i (rot), 20 μ M sTrpA (schwarz) und 10 μ M sTrpB2i mit 20 μ M sTrpA (grün). in 10 mM KP Puffer, pH 7,0, 100 mM KCl, 0,05 % Natriumazid unter Zusatz von 60 mM rac GP, 200 mM L-Serin (A), 60 mM *rac* GP (B) oder 200 mM L-Serin (C). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,6 ml/min auf einer LKB TSK 3000 SW Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Die Proteine wurden vor dem Auftrag im jeweiligen Laufpuffer verdünnt.

Die im Vergleich zu Abbildung 31 geringere Verschiebung der Elutionszeit zwischen freiem sTrpB2i und Komplex (Abbildung 32 A) ist auf die Verwendung einer anderen Gelfiltrationssäule zurückzuführen. Diese hat einen geringeren Säulendurchmesser und wurde verwendet, um das nur in geringen Mengen verfügbare sTrpB2i möglichst sparsam einzusetzen. Der Vergleich der Elutionsprofile mit beiden Liganden (Abbildung 32 A), nur GP (Abbildung 32 B) und nur Serin (Abbildung 32 C) macht deutlich, dass die Komplexbildung nur in Anwesenheit beider Liganden detektierbar ist. Das zu sTrpB2i homologe sTrpB2a bildet auch bei Anwesenheit der Liganden keinen über Gelfiltration detektierbaren Komplex (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Hypothese, dass die außerhalb des *trp*-Operons kodierten TrpB2 Proteine eine andere Funktion als die Tryptophan Biosynthese haben. Diese Fragestellung wird im zweiten Teil der Arbeit (4.2) näher beleuchtet.

Nachdem die GP-induzierte Assoziation von sTrpA mit sTrpB2i nachgewiesen war, sollten weitere bekannte Liganden von TrpA und TrpB1 auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der Komplexbildung hin untersucht werden. Dazu bot sich die Methode der analytischen Ultrazentrifugation an, mit deren Hilfe die Zusammensetzung einer Proteinprobe mit hoher Genauigkeit und niedrigem Materialverbrauch untersucht werden kann (Lebowitz et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Kooperation mit Dr. Klaus Richter (Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München) auf ein Gerät mit Fluoreszenzdetektion zurückgegriffen werden, weshalb die Varianten sTrpA S206C und sTrpA S229C hergestellt und mit dem Fluorophor Alexa 488 markiert wurden (4.1.1.2). Ein Vorteil der spezifischen Markierung einer Untereinheit (hier sTrpA) ist, dass während des Ultrazentrifugationsexperiments das Verhalten des Komplexes unabhängig von störenden Einflüssen der restlichen Komponenten (z.B. Eigenabsorption von überschüssigem nicht-komplexierten sTrpB2i oder zugesetzter Indolderivate) beobachtet werden kann. Dies führt zu einer wesentlichen Vereinfachung der Analyse der Daten.

Vor der Durchführung der Ultrazentrifugationsexperimente musste sichergestellt werden, dass die markierten sTrpA Varianten sich bezüglich ihres Komplexbildungsverhaltens nicht vom wildtypischen Enzym unterscheiden. Dazu wurden erneut analytische Gelfiltrationsläufe durchgeführt, wobei durch Verwendung eines Fluoreszenzdetektors und eines Diodenarray-Detektors das Protein und der extrinsische Farbstoff getrennt beobachtet werden konnten. Abbildung 33 zeigt exemplarisch die Analyse des Komplexbildungsverhaltens von sTrpA S206C Alexa 488 mit sTrpB2i.

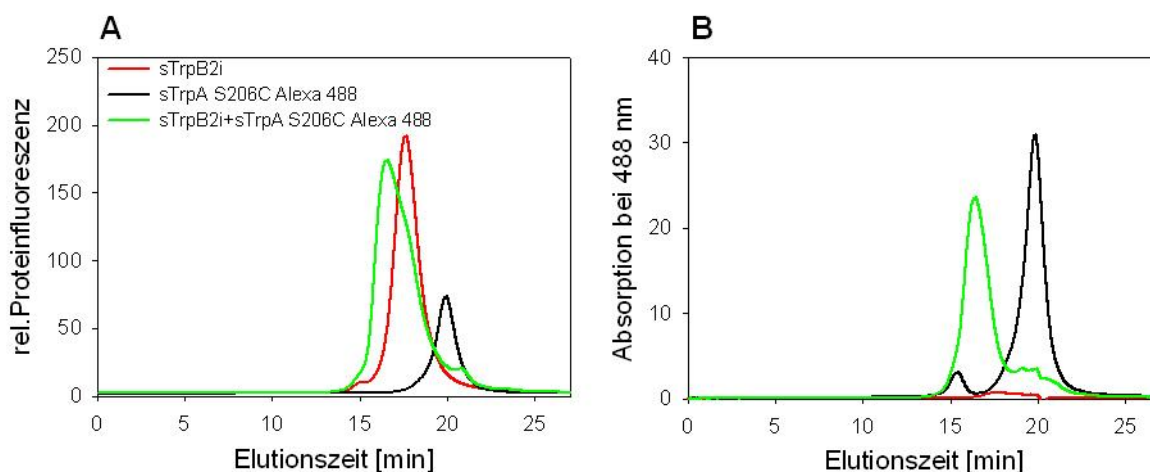


Abbildung 33: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA S206C Alexa 488 in Anwesenheit von Serin und GP.

Elutionsprofile von 20 μM sTrpB2i (rot), 3 μM sTrpA S206C Alexa 488 (schwarz) und 20 μM sTrpB2i mit 3 μM sTrpA S206C Alexa 488 (grün). **A** Detektion über Tryptophan- und Tyrosin-spezifische Proteinfluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{em}}=340$ nm) **B** Detektion über Alexa-spezifische Absorptionsmessung bei 488 nm. Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,6 ml/min in 10 mM KP Puffer, pH 7,0, 100 mM KCl, 60 mM *rac* GP, 200 mM L-Serin, 0,05 % Natriumazid auf einer LKB TSK 3000 SW Säule durchgeführt.

Abbildung 33 A zeigt die durch Fluoreszenzdetektion erhaltenen Elutionsprofile der einzelnen Proteine und deren Mischung. Bei dieser Art der Detektion ist nur die auf Tryptophan- und Tyrosinresten basierende intrinsische Proteinfluoreszenz sichtbar. Der Vergleich mit Abbildung 32 A macht deutlich, dass das Komplexbildungsverhalten von sTrpA S206C Alexa 488 unverändert gegenüber wildtypischem sTrpA ist. Bei Beobachtung des für den Farbstoff Alexa 488 spezifischen Absorptionssignals bei 488 nm (Abbildung 33 B) wird deutlich, dass der an sTrpA S206C gekoppelte, extrinsische Fluorophor nahezu quantitativ in den Komplex übergeht. Der kleine *peak* bei ca. 16 min im Elutionsprofil des isolierten TrpA Proteins (schwarz) ist unbekannten Ursprungs und im Elutionsprofil der proteinspezifischen Fluoreszenz nicht zu beobachten. In späteren Sedimentationsläufen von sTrpA S206C Alexa 488 war dieser zusätzliche *peak* nicht als eigene Spezies mit distinktem S-Wert detektierbar (Abbildung 34) und kann wohl als Artefakt der Säulenchromatographie vernachlässigt werden. Das Elutionsprofil von sTrpA S229C Alexa 488 in An- und Abwesenheit von sTrpB2i war identisch mit dem von sTrpA S206C Alexa 488 (Daten nicht gezeigt). Beide Varianten konnten folglich für analytische Ultrazentrifugationsläufe mit Fluoreszenzdetektion verwendet werden.

Um beurteilen zu können, ob sich unter dem Komplex-*peak* eine homogene Spezies oder eine Mischung mehrerer Spezies verbirgt (z.B. $\alpha\beta\beta + \alpha\beta\beta\alpha$) wurden in der analytischen Ultrazentrifuge Sedimentationsläufe durchgeführt (3.5.10.1). Zur Kontrolle wurde zunächst ein Sedimentationsexperiment mit sTrpA S206C Alexa 488 in Anwesenheit von GP und Serin durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 34 gezeigt ist.

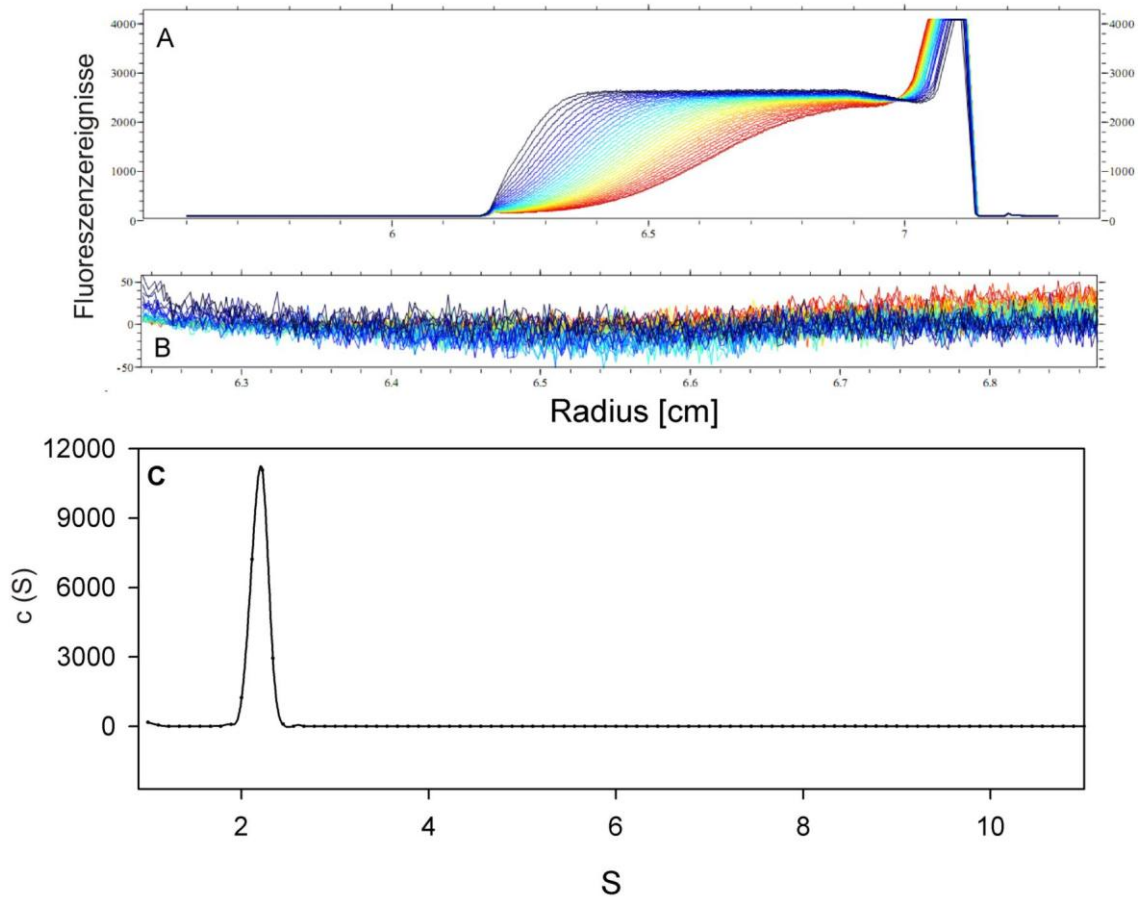


Abbildung 34: Sedimentation von sTrpA S206C Alexa488 in Anwesenheit von GP und Serin.

A Wanderung der über die Alexa488 Fluoreszenz detektierten Sedimentationsfront in farblicher Darstellung von blau nach rot. B Darstellung der radiusabhängigen Residuen beim *fit* der experimentellen Daten mit der Lamm-Gleichung (Formel 6, 3.5.10.1) C Darstellung der aus dem Ergebnis des *fits* abgeleiteten mittleren Svedberg-Konzentrationsverteilung. Das Protein sedimentiert als homogene Spezies mit einer apparenten Sedimentationskonstanten von 2,2 S. Experimentelle Bedingungen: 500 nM sTrpA S206C Alexa 488 in 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Ser, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid, T=23 °C, Zentrifugation bei 42000 Upm für 12 h in einem Ti-50 Rotor.

Die Analyse der Daten erfolgte hierbei mit dem Programm Sedfit, welches den zeitlichen Verlauf der Wanderung der Grenzschichten (Abbildung 34 A) mit Hilfe der Lamm-Gleichung (Formel 6) in eine diffusionskorrigierte Sedimentationskoeffizientenverteilung $c(s)$ (Abbildung 34 C) umwandelt. Dabei sind die in Abbildung 34 B gezeigten, radiusabhängigen Residuen der einzelnen Sedimentationsfronten ein Maß für die Güte des *fits*. Die über den gesamten Radius der Messzelle gleichmäßig verteilten Residuen deuten auf keinen systematischen Fehler in der $c(s)$ Verteilung hin. Die Analyse der Daten zeigt, dass isoliertes sTrpA als homogene Spezies mit einem S^{app} -Wert von 2,2 sedimentiert.

Anschließend wurde die Mischung aus sTrpA S206C Alexa 488 mit sTrpB2i in Anwesenheit von Serin bzw. Serin plus GP sedimentiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 A und B dargestellt.

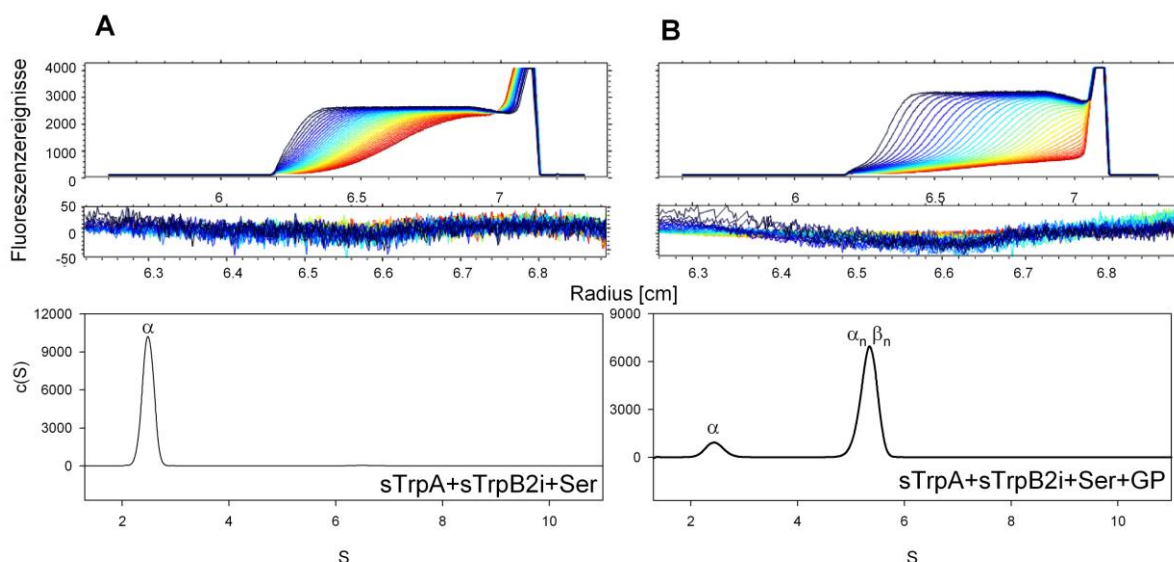


Abbildung 35: Sedimentation des Gemisches von sTrpA S206C Alexa488 mit sTrpB2i in Anwesenheit von Serin (A) bzw. Serin plus GP (B)

A Wanderung der Sedimentationsfront (oben), Residuen des *fits* mit der Lamm-Gleichung (rmsd: 12,7 Fluoreszenzeinheiten) (Mitte) und mittlere Svedberg-Konzentrationsverteilung (unten) eines Sedimentationslaufs von 500 nM sTrpA S206C Alexa 488, 3 μ M sTrpB2i in 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 0,05 % Natriumazid. **B** Wanderung der Sedimentationsfront (oben), Residuen des *fits* mit der Lamm-Gleichung (rmsd: 17,9 Fluoreszenzeinheiten) (Mitte) und mittlere Svedberg-Konzentrationsverteilung (unten) eines Sedimentationslaufs von 500 nM sTrpA S206C Alexa 488, 3 μ M sTrpB2i in 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid. Die Zentrifugation wurde bei 23 °C und 42000 Upm für 12 h in einem Ti-50 Rotor durchgeführt.

Die ligandenabhängigen Unterschiede im Sedimentationsverhalten des fluoreszenzmarkierten Proteins zeigen sich bereits in den Rohdaten des Sedimentationsexperiments (Abbildung 35 A, B, obere Reihe). Bei der Sedimentation des fluoreszenzmarkierten Proteins in Anwesenheit von GP und Serin bildet sich eine zusätzliche Sedimentationsfront aus, die in Abwesenheit von GP nicht detektierbar ist. Das Experiment belegt somit direkt die Bindung von fluoreszenzmarkiertem sTrpA-GP an sTrpB2i-Serin. Die aus dem *fit* mit der Lamm-Gleichung abgeleitete (3.5.10.1) Darstellung in der unteren Reihe von Abbildung 35 zeigt die Verteilung der anteiligen Fluoreszenzfraction als Funktion der beobachteten Sedimentationskoeffizienten, also den Anteil der verschiedenen, unterschiedlich sedimentierenden Spezies. Die Integration der Flächen zeigt, dass in Abwesenheit von GP lediglich eine Spezies mit einem S^{app} -Wert von 2,5, in Anwesenheit von GP dagegen zwei Spezies mit S^{app} 2,5 (13 % Anteil) und S^{app} 5,3 (87% Anteil) auftreten. Die Spezies mit 2,5 S entspricht dabei fast exakt dem freien sTrpA Protein (S^{app} 2,2 S, siehe Abbildung 34), die 5,3 S Spezies einem Komplex aus sTrpA und sTrpB2i mit noch unbekannter, aber homogener Zusammensetzung ($\alpha_n \beta_n$).

Um auszuschließen, dass die nicht-quantitative Komplexbildung (13 % freies sTrpA S206C Alexa 488 in Anwesenheit eines 6-fachen molaren Überschusses an sTrpB2i) auf mangelnde Sättigung mit den Liganden GP und Serin zurückzuführen ist, wurde deren Affinität zu sTrpA und sTrpB2i bestimmt. Da die Bindung von Serin an sTrpB2i

spektroskopisch nicht verfolgt werden konnte, wurde in erster Näherung die Michaelis-Menten Konstante K_M^{Ser} als Maß für die Affinität verwendet. Diese beträgt für isoliertes bzw. an sTrpA gebundenes sTrpB2i in 50 mM KP-Puffer 35 mM bzw. 46 mM, in 100 mM EPPS Puffer jeweils 7 mM (Siehe Anhang 6.3, Tabelle 8). Obwohl diese Messungen bei 60 °C durchgeführt wurden, kann angenommen werden, dass bei Raumtemperatur die bei der Zentrifugation eingesetzte Serinkonzentration von 0,2 M sowohl freies als auch komplexiertes sTrpB2i weitgehend absättigt. Um die Affinität von sTrpA für GP zu bestimmen, wurde ein indirekter Ansatz gewählt, bei dem die Änderung des Gleichgewichts der Reaktionsintermediate am aktiven Zentrum von sTrpB2i in Abhängigkeit von der GP-Konzentration gemessen wurde. Abbildung 30 zeigt, dass die Zugabe von GP zu einer Mischung aus sTrpA, sTrpB2i und Serin, eine Änderung des Absorptionsspektrums des PLP Cofaktors induziert. Diese Änderung kann auch über Beobachtung der PLP-Fluoreszenz bei ca. 500 nm verfolgt werden (Goldberg et al., 1968). Folglich wurde für eine Mischung von sTrpA, sTrpB2i und Serin mit GP titriert und die PLP-Fluoreszenz in Abhängigkeit der GP-Konzentration gemessen (Abbildung 36).

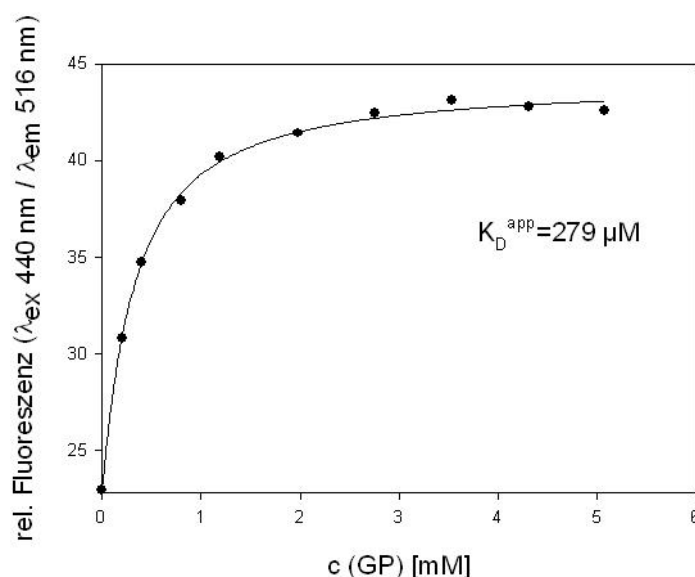


Abbildung 36: Fluoreszenztitration von sTrpA mit GP in Anwesenheit von sTrpB2i und Serin.

2 μM sTrpB2i, 4 μM sTrpA und 200 mM L-Serin wurden mit *rac* GP titriert, und die PLP Fluoreszenz im aktiven Zentrum von sTrpB2i als Maß für die Bindung von GP an das aktive Zentrum von sTrpA beobachtet. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis der Anpassung einer quadratischen Funktion (Formel 8) an die Datenpunkte, wobei sich eine apparente Dissoziationskonstante K_D^{app} von 279 nM ergab. Experimentelle Bedingungen: 14 mM KP, pH 7,0, 20 °C. Details der experimentellen Durchführung und Auswertung finden sich unter 3.5.13.1.

Aus der aus dem Experiment ermittelten apparente Dissoziationskonstante von 279 μM lässt sich schließen, dass eine Konzentration von 60 mM *rac* GP sTrpA im Komplex mit sTrpB2i vollständig absättigt. Somit ist das in Abbildung 35 B gezeigte Verhältnis an freiem (13 %) zu

komplexiertem (87 %) sTrpA in der Affinität des ligandierten Proteins zu sTrpB2i begründet. Diese wurde über verschiedene Verfahren quantifiziert (siehe Kapitel 4.1.4.2).

GP kann entweder als Analoges von GA3P oder als Analoges von IGP, also als Produkt- oder Substratanalogon angesehen werden (Heyn & Weischet, 1975; Houben & Dunn, 1990; Miles, 1979; Yanofsky & Crawford, 1972). Neben GP sind eine Reihe weiterer Liganden von TrpA beschrieben, die als kompetitive Inhibitoren wirken und in kanonischen Tryptophan Synthase Komplexen über allosterische Interaktion das aktive Zentrum von TrpB1 beeinflussen können. Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und die von ihnen imitierten Substrate, Produkte und Intermediate der TrpA-Reaktion sind in Abbildung 37 gezeigt.

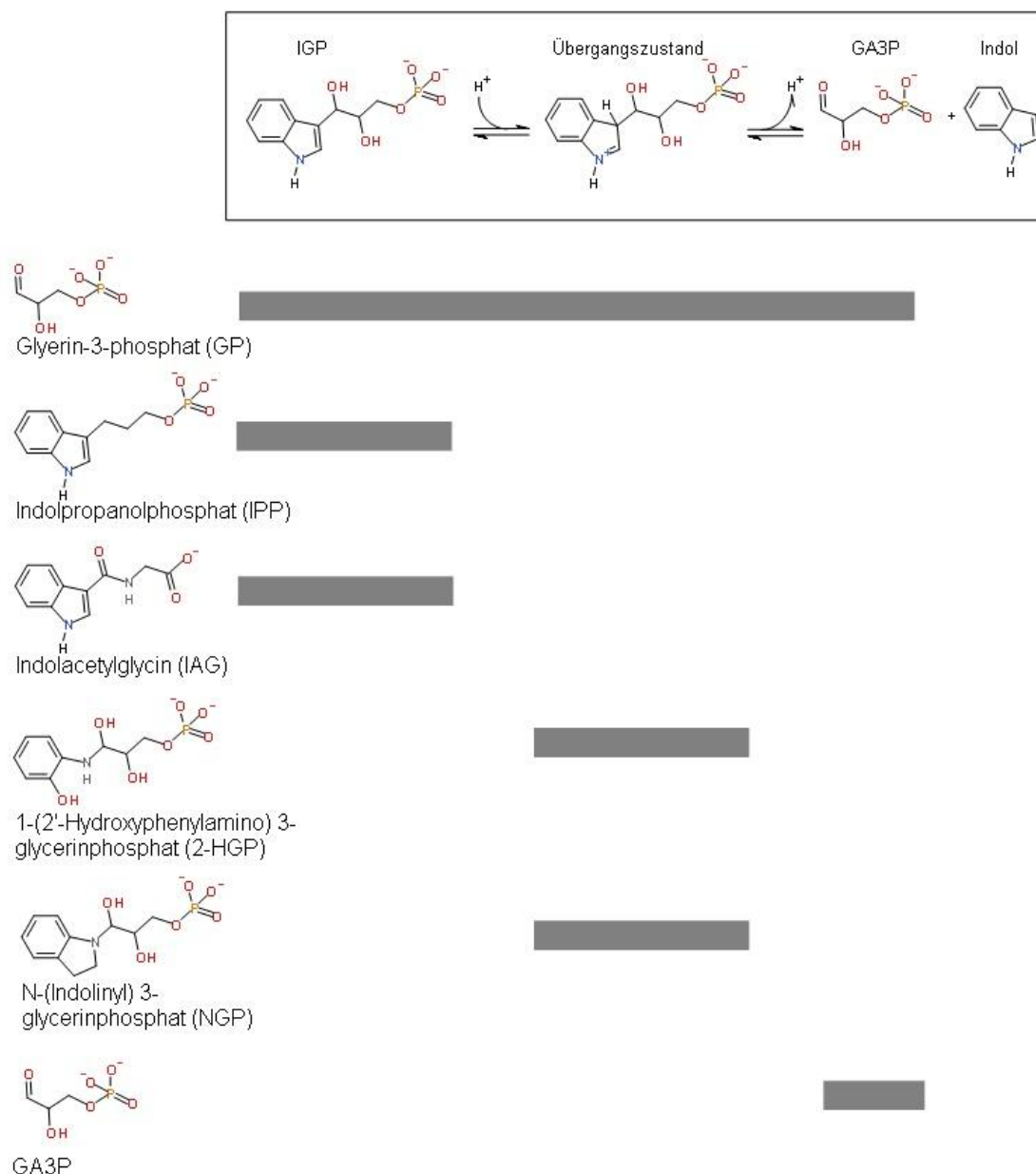


Abbildung 37: Struktur und Funktion von allosterisch aktiven TrpA-Liganden.

Die im linken Teil dargestellten Liganden von TrpA imitieren verschiedene, über die grauen Markierungen ersichtlichen, Zustände während der Reaktion (oben).

Sowohl Indolpropanolphosphat (IPP) als auch Indolacetylglutamin (IAG) sind IGP-Analoga, die bei den Tryptophan Synthasen aus *S. typhimurium* und *E. coli* nach Bindung an TrpA das aktive Zentrum von TrpB1 beeinflussen (Hyde et al., 1988; Kirschner et al., 1975a; Marabotti et al., 2000; Weyand et al., 2002b). GA3P bindet als natürliches Produkt der Reaktion ebenfalls an TrpA und beeinflusst das Gleichgewicht der Reaktionsintermediate an TrpB1 (Ngo et al., 2007). Schließlich existieren auch zwei Übergangszustandsanaloga, 2-HGP und NGP, die *in situ* von der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* aus GA3P und 2-Aminophenol bzw. Indolin gebildet werden (Barends et al., 2008; Kulik et al., 2005) (Abbildung 38).

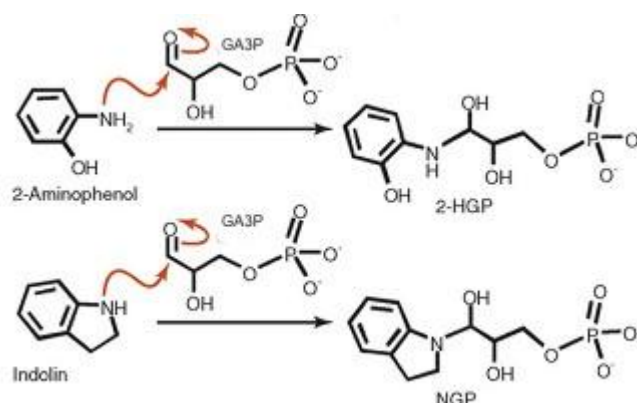


Abbildung 38: *In situ* Bildung der TrpA Übergangszustandsanaloga 2-HGP und NGP.

Das Bild wurde nach Dunn et al. (2008) modifiziert.

Um näher zu beleuchten, bei welchen Katalyseschritten der mehrstufigen Tryptophan Synthase Reaktion (Abbildung 28) ein physikalischer Komplex zwischen sTrpA und sTrpB2i vorliegt, wurden die in Abbildung 37 gezeigten allosterischen Liganden von TrpA in An- und Abwesenheit von TrpB-Liganden (Serin oder Indol) bezüglich ihres Einflusses auf die Komplexbildung getestet. Dazu wurden wiederum Sedimentationsläufe von fluoreszenzmarkiertem sTrpA mit einem Überschuss an sTrpB2i durchgeführt.

Um zu gewährleisten, dass bei den Läufen die Liganden in sättigender Konzentration vorliegen, wurden die Dissoziationskonstanten der Enzym-Ligand Komplexe, sofern dies möglich war, über Fluoreszenztitrationsverfahren bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die tryptophanfreien Varianten tmTrpA ΔW (Schwabe, 2007) und sTrpA ΔW (4.1.1) verwendet. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde die Änderung der Indolfluoreszenz des vorgelegten TrpA-Liganden in Abhängigkeit der zugegebenen Menge an TrpA ΔW gemessen. Letzteres zeigt bei den verwendeten Anregungswellenlängen eine sehr geringe Eigenfluoreszenz, die subtrahiert werden kann (3.5.13.1). Abbildung 39 zeigt Fluoreszenztitrationskurven des Substratanalogen IPP mit tmTrpA ΔW bzw. sTrpA ΔW . Die

Synthese und Reinigung von IPP erfolgte wie in Anhang 6.4 beschrieben. Zum Vergleich wurde auch die Affinität des natürlichen Substrats IGP bestimmt.

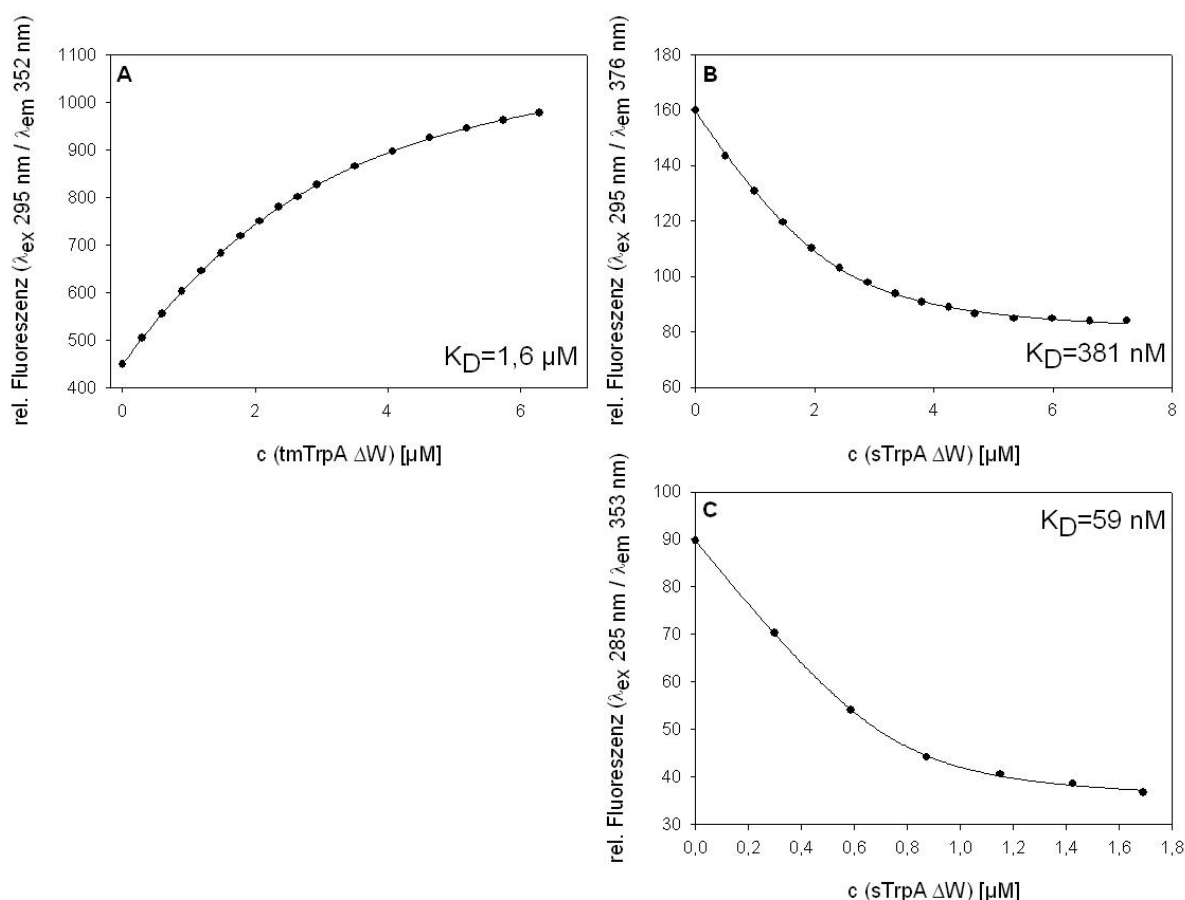


Abbildung 39: Fluoreszenztitration von IPP mit (A) tmTrpA Δ W und (B) sTrpA Δ W bzw. von IGP mit sTrpA Δ W (C).

A 1 μ M IPP wurde mit den angegebenen Konzentrationen an tmTrpA Δ W titriert B 1 μ M IPP wurde mit den angegebenen Konzentrationen an sTrpA Δ W titriert. C 1 μ M IGP wurde mit den angegebenen Konzentrationen an sTrpA Δ W titriert. Die durchgezogenen Linien zeigen das Ergebnis der Anpassung einer quadratischen Funktion (Formel 8) an die Datenpunkte, woraus die angegebenen Dissoziationskonstanten K_D ermittelt wurden. Experimentelle Bedingungen: T=25 °C, 50 mM HEPES, pH 7,5. Bei den verwendeten Excitations- und Emissionswellenlängen, die experimentell ermittelt wurden, war jeweils der größte Signalunterschied zwischen freiem und gebundenem Zustand zu beobachten. Details der experimentellen Durchführung und Auswertung finden sich unter 3.5.13.1.

Das als Referenz verwendete tmTrpA bindet IPP mit einer Dissoziationskonstante von 1,6 μ M (Abbildung 39 A). Dieser Wert ist ähnlich zu der für den Tryptophan Synthase Komplex aus *E. coli* bestimmten Inhibitionskonstante von 4 μ M gegenüber IPP (Kirschner et al., 1975b). sTrpA bindet das Substratanalogon IPP mit höherer Affinität (K_D =381 nM, Abbildung 39 B). Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die Dissoziationskonstante des natürlichen Substrats IGP (K_D =59 nM, Abbildung 39 C). Deshalb wurde für die Ultrazentrifugationsexperimente eine Konzentration von 4 μ M IPP als ausreichend angesehen.

War kein fluoreszenzabhängiges Bindungssignal messbar, so wurde versucht, apparente Dissoziationskonstanten über die Beobachtung der durch TrpA-Liganden induzierten

allosterischen Änderungen am aktiven Zentrum von TrpB, wie in Abbildung 36 für GP gezeigt, zu bestimmen.

Die Bestimmung der Affinität von sTrpA für IAG und GA3P war mit diesen Verfahren nicht möglich, da kein Bindungssignal detektiert werden konnte. In der Literatur wird ein K_i -Wert von 1,2 mM für die Inhibition von TrpA aus *S. typhimurium* durch IAG angegeben (Marabotti et al., 2000). Um Sättigung sicherzustellen, wurden 4 bzw. 11 mM IAG zum Sedimentationsansatz mit sTrpA und sTrpB2i gegeben, wobei die Verhältnisse zwischen freiem und komplexiertem sTrpA identisch blieben. Allerdings musste aufgrund der hohen Azidität von IAG das Puffersystem auf 100 mM HEPES, pH 7,5 anstatt 10 mM KP, pH 7,0 gewechselt werden, um die Konstanz der pH-Werte zu gewährleisten. Dieses Puffersystem führte jedoch in Ultrazentrifugationsexperimenten zu keiner Änderung des Komplexbildungsverhaltens in Anwesenheit von GP und Serin (Daten nicht gezeigt). Die Affinität des Produkts GA3P wurde ebenfalls, gestützt auf die Michaelis-Menten Konstante K_M^{GA3P} der Tryptophan Synthase aus *S. cerevisiae* von 1,1 mM (Bartholmes et al., 1979) abgeschätzt und ein Wert von 14 mM als sättigend angenommen.

Auf Basis der gemessenen bzw. abgeschätzten Dissoziationskonstanten für die einzelnen Liganden, wurden diese in sättigenden Mengen in das analytische Ultrazentrifugationsexperiment eingesetzt. Die Affinität der getesteten Übergangszustandsanaloge konnte, da die Bildung *in situ* erfolgte, nicht bestimmt werden. Deshalb wurden die für *S. typhimurium* angegebenen Mengen (Barends et al., 2008; Kulik et al., 2005), nämlich 14 mM GA3P, 24 mM 2-Aminophenol bzw. 12 mM Indolin verwendet. Da die Michaelis-Menten Konstanten für IGP von *S. typhimurium* Tryptophan Synthase mit 10 μ M (Ahmed et al., 1987) und *S. solfataricus* Tryptophan Synthase mit 3,5 μ M (Leopoldseder et al., 2006) bei jeweils physiologischen Temperaturen sehr ähnlich sind, kann von sättigenden Bedingungen während des durchgeführten Experiments ausgegangen werden. Um ausreichende Aktivität von sTrpA für die *in situ* Bildung der Übergangszustandsanaloge sicherzustellen, wurden die Reaktanden zu einer Mischung von sTrpA und sTrpB2i gegeben und für 10 min bei 65 °C vorinkubiert. In beiden Ansätzen zeigte sich deutliche Proteinpräzipitation (nachgewiesen über SDS-PAGE, Daten nicht gezeigt), wobei diese beim Ansatz mit Aminophenol ausgeprägter war. Die präzipitierten Proteine wurden jeweils über Zentrifugation abgetrennt und der Überstand für das analytische Ultrazentrifugationsexperiment verwendet.

Eine Zusammenfassung des Einflusses der verschiedenen allosterischen TrpA-Liganden auf das über Sedimentationsläufe analysierte Komplexbildungsverhalten von sTrpA und sTrpB2i ist in Abbildung 40 gezeigt.

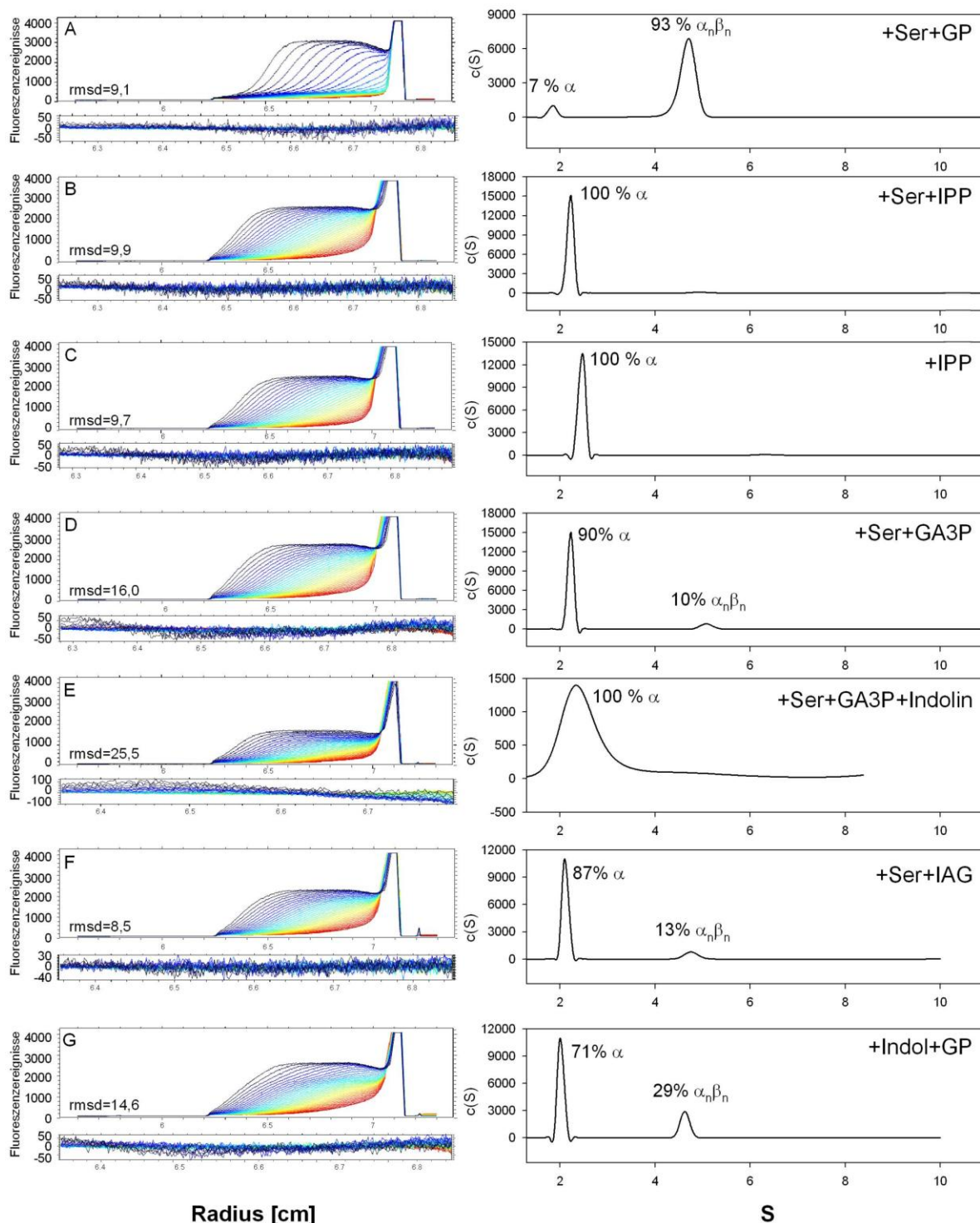


Abbildung 40: Einfluss allosterischer TrpA-Liganden sowie der TrpB-Substrate Indol und Serin auf die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2i.

Linke Spalte: Wanderung der Sedimentationsfronten und Residuen des *fits* mit der Lamm-Gleichung (Formel 6, 3.5.10.1) von Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen in Anwesenheit verschiedener Liganden. Rechte Spalte: Mittlere Svedberg-Konzentrationsverteilung der Sedimentationsläufe unter Angabe des prozentualen Anteils der beobachteten Spezies. **A** 250 nM sTrpA S206C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 200 mM L-Ser, 60 mM *rac* GP. **B** 250 nM sTrpA S206C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 200 mM L-Ser, 4 μ M IPP **C** 250 nM sTrpA S206C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 4 μ M IPP **D** 250 nM sTrpA S206C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 200 mM L-Ser, 14 mM GA3P. **E** 250 nM sTrpA S229C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 200 mM L-Ser, 14 mM GA3P, 12 mM Indolin. Der Ansatz wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert, um *in situ* den Liganden NGP zu bilden, anschließend wurde präzipitiertes Protein über

Zentrifugation abgetrennt (10 min, 16000 x g, 4 °C). E 250 nM sTrpA S229C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 200 mM L-Ser, 11 mM GA3P G 250 nM sTrpA S229C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 30 μ M Indol, 60 mM *rac* GP Experimentelle Bedingungen: Puffer 100 mM HEPES pH 7,5, 100 mM KCl; T=23 °C, Zentrifugation bei 42000 Upm für 12 h in einem Ti-50, Rotor.

Aufgrund starker Präzipitation der Proteine im Ansatz mit 2-Aminophenol, GA3P und Serin konnten nur Daten mit einem schlechten Signal- zu Rausch-Verhältnis gewonnen werden (nicht gezeigt). Die Güte der Daten war nicht ausreichend, um eine mittlere Svedberg Konzentrationsverteilung $c(S)$ gegen S zu generieren, weshalb eine Auswertung mit dem dc/dt Ansatz durchgeführt wurde (3.5.10.1) (Stafford, 1992). Bei dieser Methode wird, anders als bei der $c(s)$ Methode, keine Korrektur um Diffusionseffekte durchgeführt, was die Auflösung verringert (Lebowitz et al., 2002). Um die Vergleichbarkeit der beiden Methoden sicherzustellen, wurden als Kontrolle die Läufe mit Ser+GP, Ser+IPP und IPP zusätzlich mit der dc/dt Methode ausgewertet (Abbildung 41).

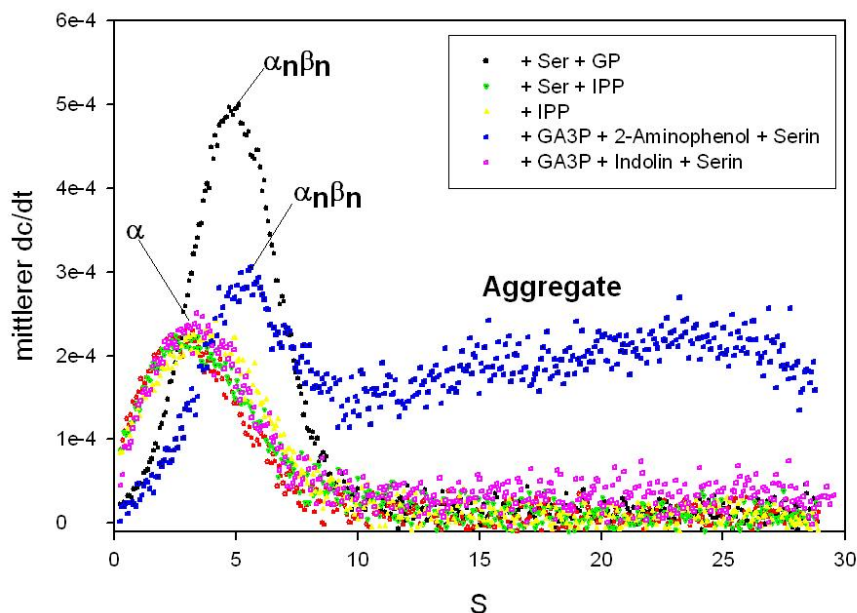


Abbildung 41: dc/dt Ansatz zur Untersuchung des Einflusses einiger allosterischer TrpA-Liganden sowie Serin auf die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2i.

Gezeigt ist die mittlere Svedberg-Konzentrationsverteilung der Sedimentationsläufe in Anwesenheit verschiedener Liganden. Blau: 250 nM sTrpA S229C Alexa 488, 6 μ M sTrpB2i, 200 mM L-Ser, 14 mM GA3P, 24 mM 2-Aminophenol. Der Ansatz wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert, um *in situ* den Liganden 2-HGP zu bilden, anschließend wurde präzipitiertes Protein über Zentrifugation abgetrennt (10 min, 16000 x g, 4 °C) Alle anderen Proben und die experimentellen Bedingungen entsprechen denen in Abbildung 40.

Bei den mit beiden Methoden ausgewerteten Läufen lieferten die dc/dt und die $c(s)$ Analysen sehr ähnliche Ergebnisse. Eine exakte Quantifizierung der Verteilungen in Abbildung 41 konnte aufgrund der Überlappung des α - und $\alpha_n\beta_n$ -peaks nicht durchgeführt werden. Die *peak*-Verbreiterung ist dabei auf die fehlende Diffusionskorrektur bei dc/dt zurückzuführen (Lebowitz et al., 2002).

Die bestimmten Verhältnisse zwischen freiem und komplexiertem sTrpA sind in Anwesenheit verschiedener Liganden sehr unterschiedlich (Abbildung 40 und Abbildung 41). Der Komplex war lediglich in Anwesenheit von Serin und GP (Abbildung 40 A, 93 % Komplex, Abbildung 41, schwarz), Serin und GA3P (Abbildung 40 D, 10 % Komplex), Serin und IAG (Abbildung 40 F, 13 % Komplex) sowie Indol und GP (Abbildung 40 G, 29 % Komplex) detektierbar. Weder die Anwesenheit des Substratanalogons IPP (Abbildung 40 B und C, Abbildung 41 grün und gelb), noch des Übergangszustandsanalogons NGP (Abbildung 40 E, Abbildung 41 pink) führten zu einer messbaren Komplexbildung. Allerdings sollte angemerkt werden, dass nicht klar ist, ob sTrpA *in situ* die Bildung von NGP katalysieren kann. Offensichtlich bewirkte aber die Inkubation der Proteine mit 2-Aminophenol, GA3P und Serin die Bildung des Übergangszustandsanalogons 2-HGP, da neben einer signifikanten Menge an höheren Aggregaten, nur der $\alpha_n\beta_n$ Komplex und kein freies α nachweisbar war (Abbildung 41 blau). Es sollte angemerkt werden, dass das Sedimentationsverhalten der beobachteten $\alpha_n\beta_n$ Komplexe bei allen Ansätzen nahezu identisch war ($S^{\text{app}} \sim 5,0$), was ein deutlicher Beleg für identische Quartärstrukturen der durch die wirksamen Liganden induzierten Tryptophan Synthase Komplexe ist.

Da man für die Liganden GP, Serin und wohl auch IAG und GA3P sättigende Konzentrationen annehmen kann, kann postuliert werden, dass sich die Affinität von sTrpA zu sTrpB2i je nach gebundenem Liganden unterscheidet. Unter der Annahme, dass auch sTrpA und sTrpB2i, ähnlich wie die Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium*, eine Konformationsänderung bei Ligandenbindung durchlaufen, und diese sowohl die allosterische Kommunikation als auch eine affinere Bindung zum jeweiligen Partnerprotein verursachen (Dunn et al., 2008; Rhee et al., 1997; Schneider et al., 1998), muss davon ausgegangen werden, dass diese Konformationsänderung je nach gebundenem Ligand unterschiedlich ist. Die Ursache hierfür könnte eine unzureichende Ähnlichkeit zwischen den verwendeten Liganden und den tatsächlich während der Katalyse im aktiven Zentrum auftretenden Intermediaten sein. Dies gilt natürlich nicht für die verwendeten natürlichen Liganden GA3P, Serin und Indol.

Kategorisiert man die komplexinduzierenden Liganden nach Substrat-, Übergangszustands- und Produktanaloga (Abbildung 37), so findet man in allen drei Klassen Substanzen, die den Komplex zumindest teilweise induzieren. Daraus folgt, dass während des gesamten Katalysezyklus im aktiven Zentrum von TrpA ein physikalischer Komplex mit sTrpB2i besteht und dieser immer dieselbe Stöchiometrie $\alpha_n\beta_n$ aufweist.

4.1.4.2 Stöchiometrie und Affinität des ligandeninduzierten Komplexes

Die prototypischen Tryptophan Synthasen aus *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. furiosus* und *T. maritima* bilden einen stabilen, tetrameren Komplex der Zusammensetzung $\alpha\beta\alpha$. Die Dissoziationskonstante der TrpA und TrpB1 Untereinheiten liegt dabei im nanomolaren

Bereich (Hettwer & Sterner, 2002; Hiraga & Yutani, 1996; Hyde et al., 1988; Leopoldseder et al., 2006; Ogasahara et al., 2003). Die bisherigen Untersuchungen der Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* zeigten, dass die Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2i transient, dynamisch und abhängig von der Anwesenheit von TrpA- und TrpB-Liganden ist. Durch Aktivitätstitrationen, bei denen die sTrpA Aktivität in Abhängigkeit von der zugegebenen sTrpB2i Menge gemessen wurden, konnten apparente Dissoziationskonstanten von 22 μM (ohne Serin) bzw. 280 nM (mit Serin) bestimmt werden (Leopoldseder et al., 2006). Die Stöchiometrie der Untereinheiten des transienten Komplexes konnte bisher jedoch nicht ermittelt werden.

Nachdem es nunmehr jedoch gelungen war, den Komplex durch die Zugabe von GP und Serin zu stabilisieren, sollte die Stöchiometrie im weiteren Verlauf der Arbeit mit verschiedenen Methoden geklärt und die Affinität der beiden Untereinheiten sTrpA und sTrpB2i in Abwesenheit katalytischer Aktivität ermittelt werden.

Zur Bestimmung der Stöchiometrie und Affinität wurde zunächst die Methode der Fluoreszenztitration verwendet. Dabei wurde, analog zur Messung der Affinität von TrpA zu seinen Liganden IPP und IGP (Abbildung 39), die Tryptophanfluoreszenz von sTrpB2i in Abhängigkeit der Konzentration von sTrpA ΔW gemessen. Zur Validierung der Methode wurde zunächst tmTrpB1 mit tmTrpA ΔW titriert (Abbildung 42).

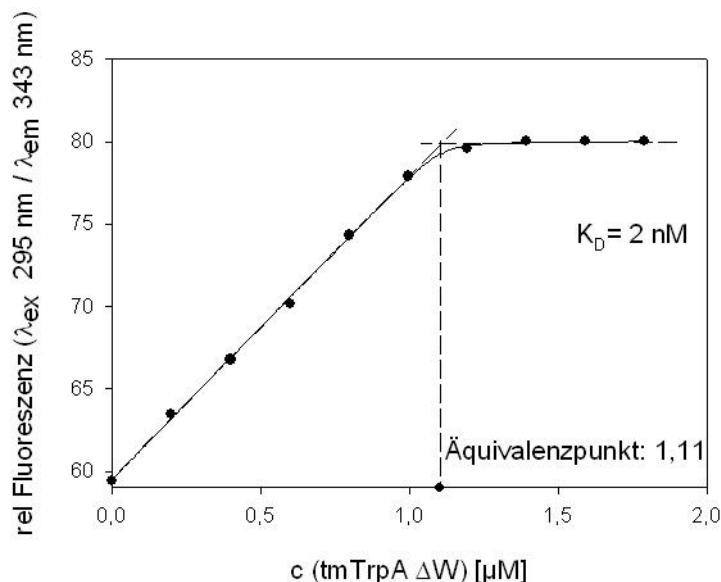


Abbildung 42: Tryptophanspezifische Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante und Stöchiometrie des Tryptophan Synthase Komplexes aus *T. maritima*.

tmTrpB1 mit einer Untereinheitenkonzentration von 1 μM wurde mit den angegebenen Konzentrationen an tmTrpA ΔW titriert. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis der Anpassung einer quadratischen Funktion (Formel 8) an die Datenpunkte, woraus die angegebene Dissoziationskonstante K_D und der Äquivalenzpunkt ermittelt wurden. Die Lage des Äquivalenzpunkts und damit die Stöchiometrie der Bindung, ist graphisch durch die unterbrochenen Linien verdeutlicht. Experimentelle Bedingungen: 50 mM KP, pH 7,5, 25 °C. Details der experimentellen Durchführung und Auswertung finden sich unter 3.5.13.2 .

Die ermittelte Dissoziationskonstante von 2 nM deckt sich halbwegs mit den aus der Affinitätstitration von tmTrpA mit tmTrpB1 erhaltenen Werten von 0,3 nM (ohne Serin) und 0,4 nM (mit Serin) (Leopoldseder et al., 2006). Aufgrund der hohen Affinität ergibt sich ein klar auswertbarer Äquivalenzpunkt der Titration von 1,11, der die bekannte 1:1 Untereinheitenstöchiometrie des $\alpha\beta\alpha$ -Komplexes bestätigt. Eine Fluoreszenztitration von tmTrpA und tmTrpB1 in Anwesenheit von GP und Serin war nicht möglich, da sich durch die Bindung von tmTrpA an tmTrpB1 das Gleichgewicht zwischen $E(A_{ex1})$ und $E(A-A)$ verschiebt, was zu einer starken Zunahme der Absorption um 340 nm führt (Abbildung 29). Diese Absorptionsänderung wirkt der Emissionszunahme bei Komplexbildung bei 343 nm entgegen und verhinderte eine Auswertung der Daten.

Analoge Titrationsexperimente, bei denen sTrpB2i in Anwesenheit von GP und Serin mit sTrpA ΔW titriert wurde, waren aufgrund des schlechten Signal- zu Rauschverhältnisses ebenfalls nicht zuverlässig auswertbar. Um trotzdem die Affinität der beiden Proteine unter diesen Bedingungen messen zu können, wurde nicht die tryptophanspezifische Fluoreszenz, sondern die Fluoreszenz des TrpB Cofaktors PLP gemessen, welche in der *E. coli* Tryptophan Synthase empfindlich auf die Anwesenheit von TrpA reagiert (Lane et al., 1984). Zur Validierung der Methode wurde wiederum zunächst eine Titration von tmTrpB1 mit tmTrpA durchgeführt (Abbildung 43).

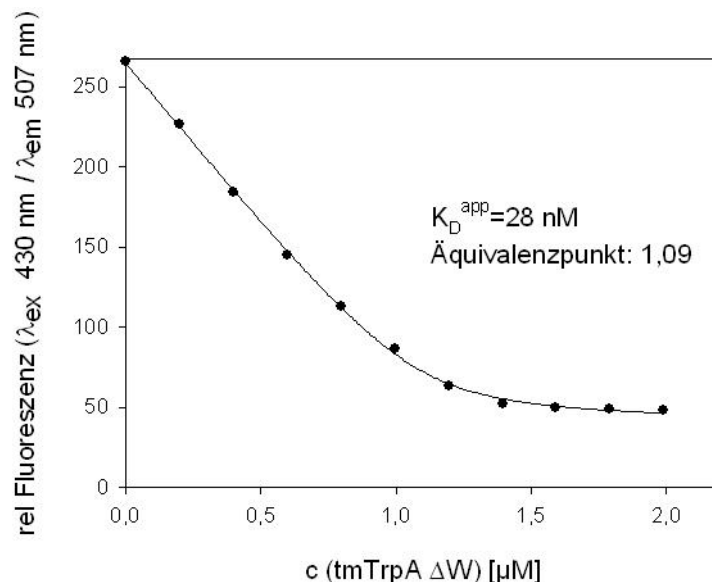


Abbildung 43: PLP-spezifische Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante und Stöchiometrie des Tryptophan Synthase Komplexes aus *T. maritima*.

tmTrpB1 mit einer Untereinheitenkonzentration von 1 μM wurde mit den angegebenen Konzentrationen an tmTrpA ΔW titriert. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis der Anpassung einer quadratischen Funktion (Formel 8) an die Datenpunkte, woraus die angegebene Dissoziationskonstante K_D sowie der Äquivalenzpunkt und damit die Stöchiometrie der Bindung ermittelt wurden. Experimentelle Bedingungen: 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid, 25 °C. Details der experimentellen Durchführung und Auswertung finden sich unter 3.5.13.3.

Die ermittelte apparente Dissoziationskonstante in Anwesenheit der Liganden GP und Serin weicht mit einem Wert von 28 nM eine Größenordnung von der Dissoziationskonstante aus der Fluoreszenztitration von tmTrpA mit tmTrpB1 in Abwesenheit der Liganden (2 nM, Abbildung 42) ab. Die ermittelte Stöchiometrie des Komplexes ist mit Äquivalenzpunkten von 1,11 bzw. 1,09 nahezu identisch. Analoge Titrationsexperimente, bei denen sTrpB2i in Anwesenheit von GP und Serin mit tryptophanfreiem sTrpA titriert wurden zeigten sich durch ein akzeptables Signal- zu Rauschverhältnis aus und waren zuverlässig auswertbar (Abbildung 44).

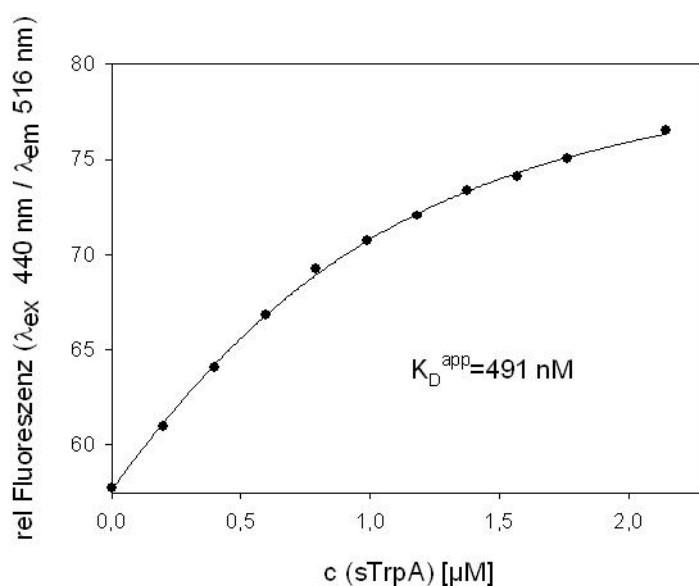


Abbildung 44: PLP-spezifische Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des Tryptophan Synthase Komplexes aus *S. solfataricus*.

sTrpB2i mit einer Untereinheitenkonzentration von 1 μM wurde mit den angegebenen Konzentrationen an sTrpA titriert. Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis der Anpassung einer quadratischen Funktion (Formel 8) an die Datenpunkte, woraus die angegebene Dissoziationskonstante K_D ermittelt wurde. Experimentelle Bedingungen: 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid, 25 °C. Details der experimentellen Durchführung und Auswertung finden sich unter 3.5.13.3.

Im Vergleich zu dem für den kanonischen *T. maritima* Tryptophan Synthase Komplex ermittelten Wert von 28 nM ist die ermittelte apparente Dissoziationskonstante in Anwesenheit der Liganden GP und Serin für den *S. solfataricus* Komplex mit 491 nM deutlich höher. Aufgrund dieser niedrigen Affinität konnte kein zuverlässiger Äquivalenzpunkt bestimmt und somit keine Aussage über die Stöchiometrie getroffen werden.

Berechnet man die Dissoziationskonstante aus den Verteilungen von freiem und gebundenem sTrpA in Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen (3.5.10.1, Abbildung 35 B), so ergibt sich ein Wert von 383 nM für einen αββα Komplex, bzw. ein Wert von 318 nM für einen αββ Komplex. Bestimmt man die Dissoziationskonstante aus den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen mit anderen Konzentrationsverhältnissen der Proteine (12-facher statt 6-facher molarer Überschuss an sTrpB2i Untereinheiten, Abbildung

40 A), so ergeben sich sehr ähnliche Werte von 437 ($\alpha\beta\beta\alpha$ Komplex) bzw. 416 nM ($\alpha\beta\beta$ Komplex). Die Dissoziationskonstanten aus Fluoreszenztitration und Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen stützen sich somit gegenseitig. Um eine Untergrenze für die Dissoziationskonstante in Abwesenheit von GP abschätzen zu können, wurde angenommen, dass in einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment in Abwesenheit von GP (Abbildung 35 A) ein Anteil von 0,5 % an komplexiertem sTrpA gerade noch sichtbar wäre. Dadurch lässt sich eine Untergrenze der Dissoziationskonstante in Anwesenheit von Serin und Abwesenheit von GP auf ca. 600 μ M abschätzen, was einer Affinitätssteigerung um den Faktor 1000 durch die Bindung von GP entsprechen würde.

Als weitere Methode zur Bestimmung der Affinität und Stöchiometrie des Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i wurden isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) Experimente in Anwesenheit von GP und Serin durchgeführt (Abbildung 45).

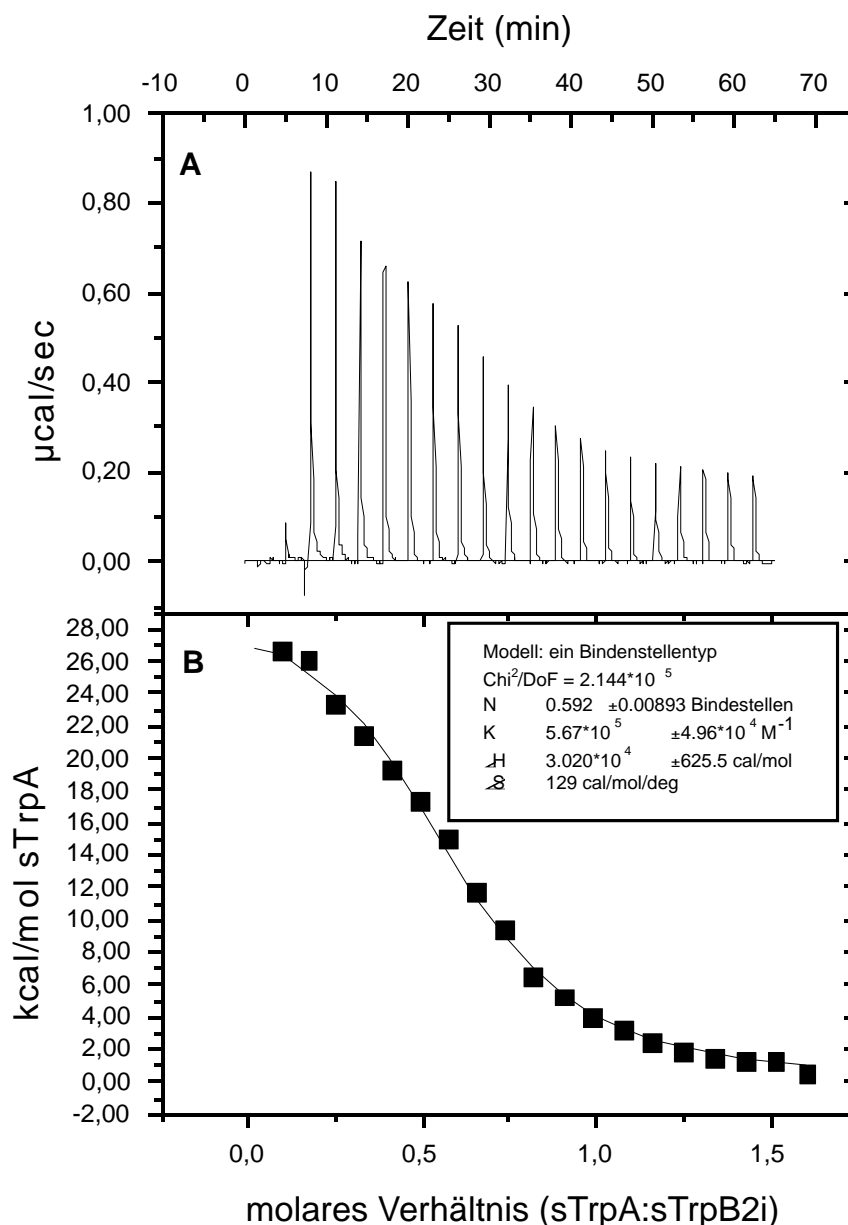


Abbildung 45: Isothermische Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Assoziationskonstante und Stöchiometrie des Tryptophan Synthase Komplexes aus *S. solfataricus*.

A Rohdaten der Titration von sTrpB2i mit sTrpA. Die Wärmetönung wurde als Funktion der Zeit aufgezeichnet, wobei sukzessive 2 μl Injektionen von sTrpA (191,4 μM) in die Probenzelle mit sTrpB2i (24,6 μM Untereinheiten) zugegeben wurden. **B** Die Integration der Injektions-peaks ergab eine Bindungsisotherme, an die sich ein Modell für eine Art von Bindestelle und den Variablen K (Assoziationskonstante), N (Stöchiometrie sTrpA:sTrpB2i) und ΔH (Enthalpieänderung) anpassen lässt (3.5.14). Die durchgezogene Linie zeigt die angepasste Kurve und das Inset die erhaltenen Werte für K , N und ΔH . Der Wert für ΔS berechnet sich über die freie Enthalpie (ΔG) durch die Zusammenhänge $\Delta G = -RT \cdot \ln K$ und $\Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T$. Experimentelle Bedingungen: 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 0,05 % Natriumazid; $T = 20^\circ\text{C}$ (293 K).

Die aus dem ITC Experiment ermittelte Assoziationskonstante K ($5,67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) verhält sich reziprok zur Dissoziationskonstante K_D , wodurch sich für letztere ein Wert von 1,76 μM ergibt. Die freie Enthalpie ΔG der Komplexbildung bei 20°C errechnet sich mit ($\Delta G = -RT \cdot \ln K$) zu -32 kJ/mol. Die Stöchiometrie N , also das Verhältnis der aktiven Zentren von TrpA zu TrpB liegt bei 0,59. Bei einem prototypischen $\alpha\beta\alpha$ Komplex wäre $N=1$ zu erwarten gewesen. Die ITC Titration zeigt, dass die Assoziation von sTrpA und sTrpB2i in Gegenwart

von GP und Serin enthalpisch ungünstig ($\Delta H=126$ kJ/mol) ist und deshalb wegen $\Delta G=\Delta H-T\Delta S$ entropisch begünstigt sein muss ($T\Delta S=158$ kJ/mol). Aufgrund der starken Entropieabhängigkeit der Assoziation kann davon ausgegangen werden, dass bei physiologischen Temperaturen (ca. 80 °C) die Dissoziationskonstante deutlich niedriger ist. Die Entropiezunahme während der Assoziation kann entweder durch Erhöhung der Flexibilität der beteiligten Proteine, oder durch die Freisetzung von proteingebundenem Lösungsmittel erklärt werden. Diese Erhöhung der Freiheitsgrade des Lösungsmittels ist charakteristisch für hydrophobe Interaktionen.

Vergleicht man die erhaltenen thermodynamischen Parameter mit denen des Komplexes der Tryptophan Synthasen aus *P. furiosus* und *E. coli* (Ogasahara et al., 2003), so zeigen sich signifikante Unterschiede. In beiden Fällen ist die Assoziation der α - und β - Untereinheiten enthalpisch stark begünstigt, bei *P. furiosus* liegt zusätzlich ein vorteilhafter Entropieterm vor. Diese thermodynamischen Parameter schlagen sich in einer stark negativen freien Enthalpie nieder, wodurch die Dissoziationskonstanten der Komplexe, ähnlich wie diejenigen aus *T. maritima*, im niedrigen nanomolaren Bereich liegen. Die Stöchiometrien dieser prototypischen Tryptophan Synthasen liegen bei $N=1$.

Bei der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* wurde über P-jump und T-jump Experimente ermittelt, dass die Konformationsänderung beim Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation des $\alpha\beta\alpha$ Komplexes, die auch durch Bindung von Liganden wie GP und Serin induziert wird, ein durch Freisetzung von Wasser begünstigter, Entropie-getriebener Prozess ist (Phillips et al., 2008a; Phillips et al., 2005; Phillips et al., 2008b). Die Entropie-getriebene Bildung des Tryptophan Synthase Komplexes aus *S. solfataricus* lässt somit vermuten, dass dieser ebenfalls in einer geschlossenen Konformation vorliegt.

Vergleicht man die Dissoziationskonstanten der Komplexbildung von sTrpA und sTrpB2i aus ITC (Abbildung 45), Fluoreszenztitration (Abbildung 44) und Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen (Abbildung 35 B und Abbildung 37 A), so erhält man Werte von 1760, 491 und 318-417 nM, was eine maximale Abweichung von einem Faktor 5 ergibt. Diese Abweichung kann angesichts der Tatsache, dass sehr unterschiedliche Signale bei den einzelnen Methoden beobachtet werden, als akzeptabel angesehen werden. Die Bindungsaffinität zwischen sTrpA und sTrpB2i liegt damit selbst in Anwesenheit der Komplex-stabilisierenden Liganden um mehrere Größenordnungen unterhalb der von kanonischen Tryptophan Synthasen, wie beispielsweise der aus *T. maritima* (Abbildung 42 und Abbildung 43).

Die bei den ITC-Messungen ermittelte Stöchiometrie von 0,59 sTrpA:sTrpB2i deutet darauf hin, dass die Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* in Anwesenheit der Liganden Serin und GP als $\alpha\beta\beta$ Komplex vorliegt. Diese ungewöhnliche Stöchiometrie sollte durch weitere

Methoden widerlegt oder bestätigt werden. Dazu wurden Gelfiltrationsexperimente mit densitometrischer Auswertung des fraktionierten Komplex-*peaks* und Gleichgewichtsläufe in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt.

Zur Validierung der densitometrischen Bestimmung der Stöchiometrie nach Gelfiltration in Anwesenheit der Liganden GP und Serin wurde zunächst wiederum der tetramere $\alpha\beta\alpha$ Tryptophan Synthase Komplex aus *T. maritima* untersucht (Abbildung 46).

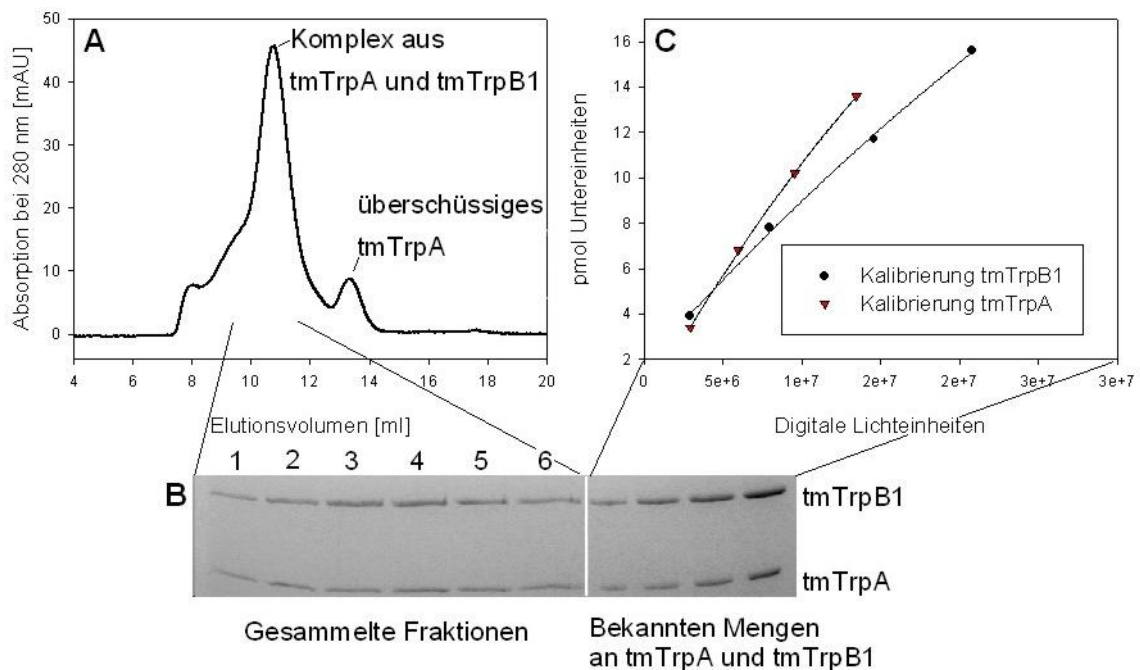


Abbildung 46: Analytische Gelfiltration und densitometrische Kalibrierung zur Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus *T. maritima*.

A Elutionsprofil einer Mischung aus 39 μM tmTrpB1 (Untereinheiten) und 68 μM tmTrpA (in 45 μl). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min in 10 mM KP Puffer, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid auf einer Superdex S75 Säule durchgeführt. **B** SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) der gesammelten Fraktionen des Gelfiltrationslaufs und von Kalibrierstandards (4-16 pmol Untereinheiten) von tmTrpB1 und tmTrpA. **C** Densitometrische Auswertung der Kalibrierstandards. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben.

Die während des Gelfiltrationslaufs (Abbildung 33 A) gesammelten Fraktionen wurden gemeinsam mit Kalibrierstandards über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 33 B). Die über die Standards erstellten Kalibriergeraden (Abbildung 33 C) dienten zur absoluten Quantifizierung der beiden Proteine in den gesammelten Fraktionen (Abbildung 47).

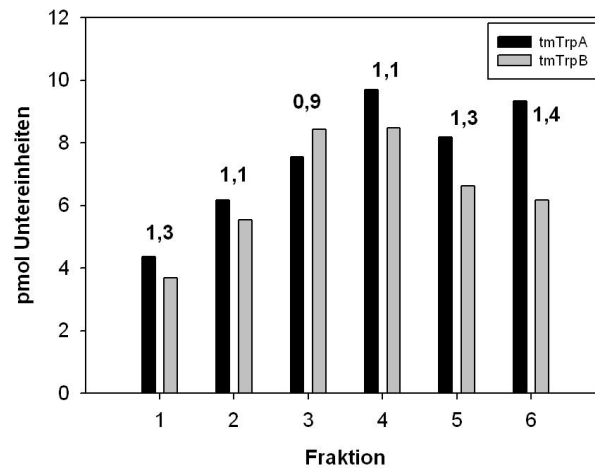


Abbildung 47: Densitometrische Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus *T. maritima*.

Densitometrische Auswertung der experimentellen Daten aus Abbildung 46. Aufgetragen ist die molare Menge von tmTrpA und tmTrpB1 in den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration, die den Komplex-*peak* enthielten. Die Zahlenwerte geben das stöchiometrische Verhältnis N von tmTrpA zu tmTrpB1, bezogen auf die Untereinheiten, an.

Alle untersuchten Fraktionen enthalten ein ausgeglichenes molares Verhältnis der tmTrpA zu tmTrpB1 Untereinheiten, mit einem Mittelwert von $N=1,1$. Somit konnte die erwartete 1:1 Stöchiometrie durch das beschriebene Verfahren bestätigt und analoge Experimente zur Stöchiometriebestimmung von sTrpA und sTrpB2i durchgeführt werden. Abbildung 48 zeigt das Ergebnis der analytischen Gelfiltration und densitometrischen Kalibrierung.

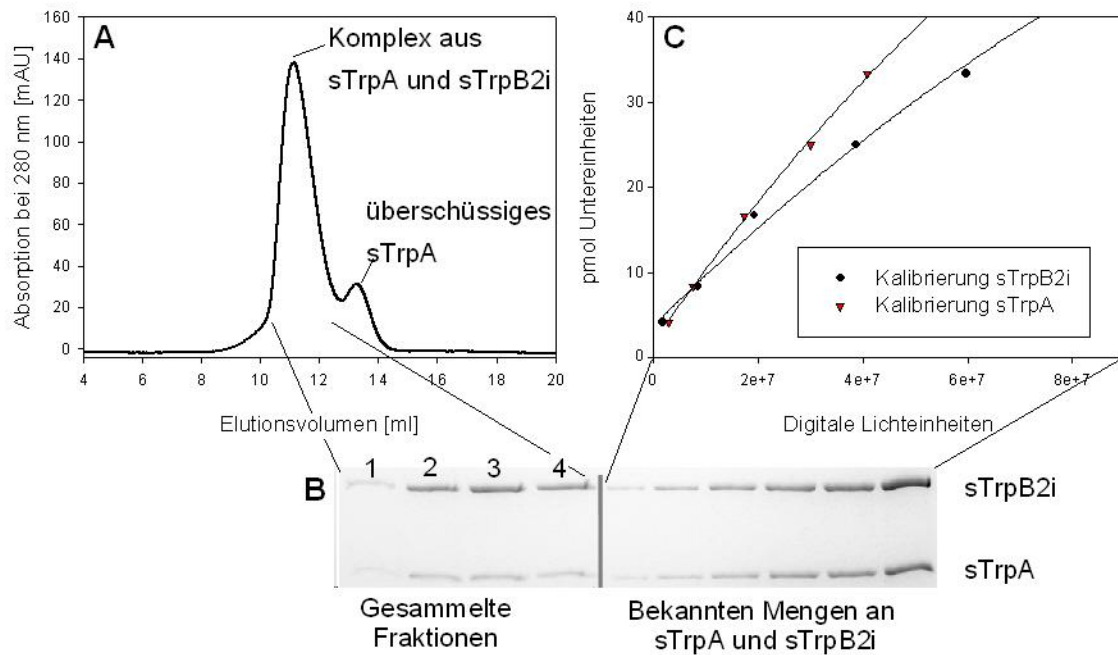


Abbildung 48: Analytische Gelfiltration und densitometrische Kalibrierung zur Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus *S. solfataricus*.

A Elutionsprofil einer Mischung von 41 μM sTrpB2i (Untereinheiten) und 62 μM sTrpA (in 250 μl). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min in 10 mM KP Puffer, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid auf einer Superdex S75 Säule durchgeführt. **B** SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) der gesammelten Fraktionen des Gelfiltrationslaufs und von Kalibrierstandards (4-35 pmol Untereinheiten) von sTrpB2i und sTrpA. **C** Densitometrische Auswertung der Kalibrierstandards. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben.

In Abbildung 49 ist das Ergebnis der Stöchiometriebestimmung dargestellt.

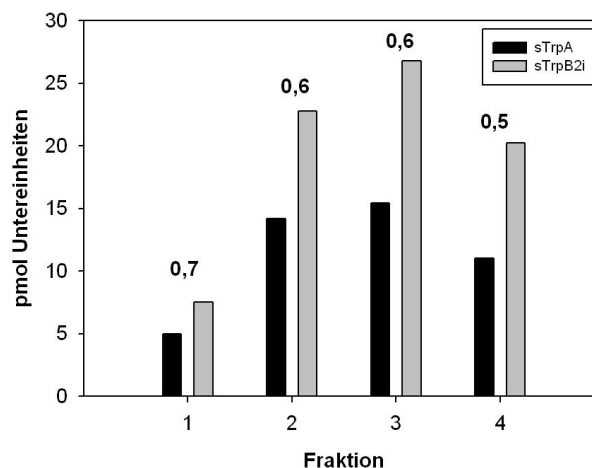


Abbildung 49: Densitometrische Stöchiometriebestimmung des Tryptophan Synthase Komplexes aus *S. solfataricus*.

Densitometrische Auswertung der experimentellen Daten aus Abbildung 48. Aufgetragen ist die molare Menge von sTrpA und sTrpB2i in den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration, die den Komplex-peak enthielten. Die Zahlenwerte geben das stöchiometrische Verhältnis N von sTrpA zu sTrpB2i, bezogen auf die Untereinheiten an.

Alle untersuchten Fraktionen enthalten einen molaren Unterschuss an Untereinheiten von sTrpA im Vergleich zu sTrpB2i, mit einem Mittelwert von $N=0,6$. Dies kommt einem $\alpha\beta\beta$ Komplex mit $N=0,5$ nahe. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der isothermischen Titrationskalorimetrie, bei der für N ein Wert von 0,59 ermittelt wurde (Abbildung 45).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine fehlerhafte Konzentrationsbestimmung von sTrpB2i, welche aufgrund der starken Eigenabsorption des Cofaktors PLP bei 280 nm nicht über UV-Absorptionsspektroskopie sondern mittels Bradfordbestimmung (3.5.2) erfolgte, das Ergebnis der Stöchiometriebestimmung bei beiden Experimenten verfälscht haben könnte. Das Kontrollexperiment der densitometrischen Bestimmung mit der Tryptophan Synthase aus *T. maritima* lieferte allerdings keinen Hinweis auf eine derartige Verfälschung, da die korrekte Stöchiometrie gefunden wurde (Abbildung 47). Trotzdem wurden die Stöchiometrie und das Molekulargewicht des Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i über eine dritte Methode untersucht, bei der die Konzentration von sTrpB2i keine Rolle spielt, da es im Überschuss vorliegt. Dazu wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Gleichgewichtsläufe von sTrpA S206C Alexa 488 in An- und Abwesenheit von sTrpB2i durchgeführt. Im Unterschied zu den in 4.1.4.1 beschriebenen Sedimentationsexperimenten, wird bei Gleichgewichtsexperimenten eine niedrigere Drehzahl der analytischen Ultrazentrifuge gewählt, wodurch sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation im Zentrifugalfeld und der Rückdiffusion der Teilchen einstellt (3.5.10.2). Dadurch erhält man die Möglichkeit, absolute Molekulargewichte und damit Untereinheiten-Stöchiometrien heterooligomerer Komplexe zu bestimmen, ohne dass Informationen über die Form der beobachteten Teilchen zu benötigen (Lebowitz et al., 2002).

Um sicherzustellen, dass die Anwesenheit von GP und Serin, welches zur Komplexbildung nötig ist, den Oligomerisierungszustand der sTrpA und sTrpB2i Proteine nicht beeinflusst, wurden deren Molekulargewichte auch einzeln bestimmt. Abbildung 50 zeigt das Ergebnis der Gleichgewichtsläufe von sTrpB2i, sTrpA S206C Alexa 488 und einer Mischung aus sTrpA S206C Alexa 488 mit einem 18-fach molaren Überschuss an sTrpB2i.

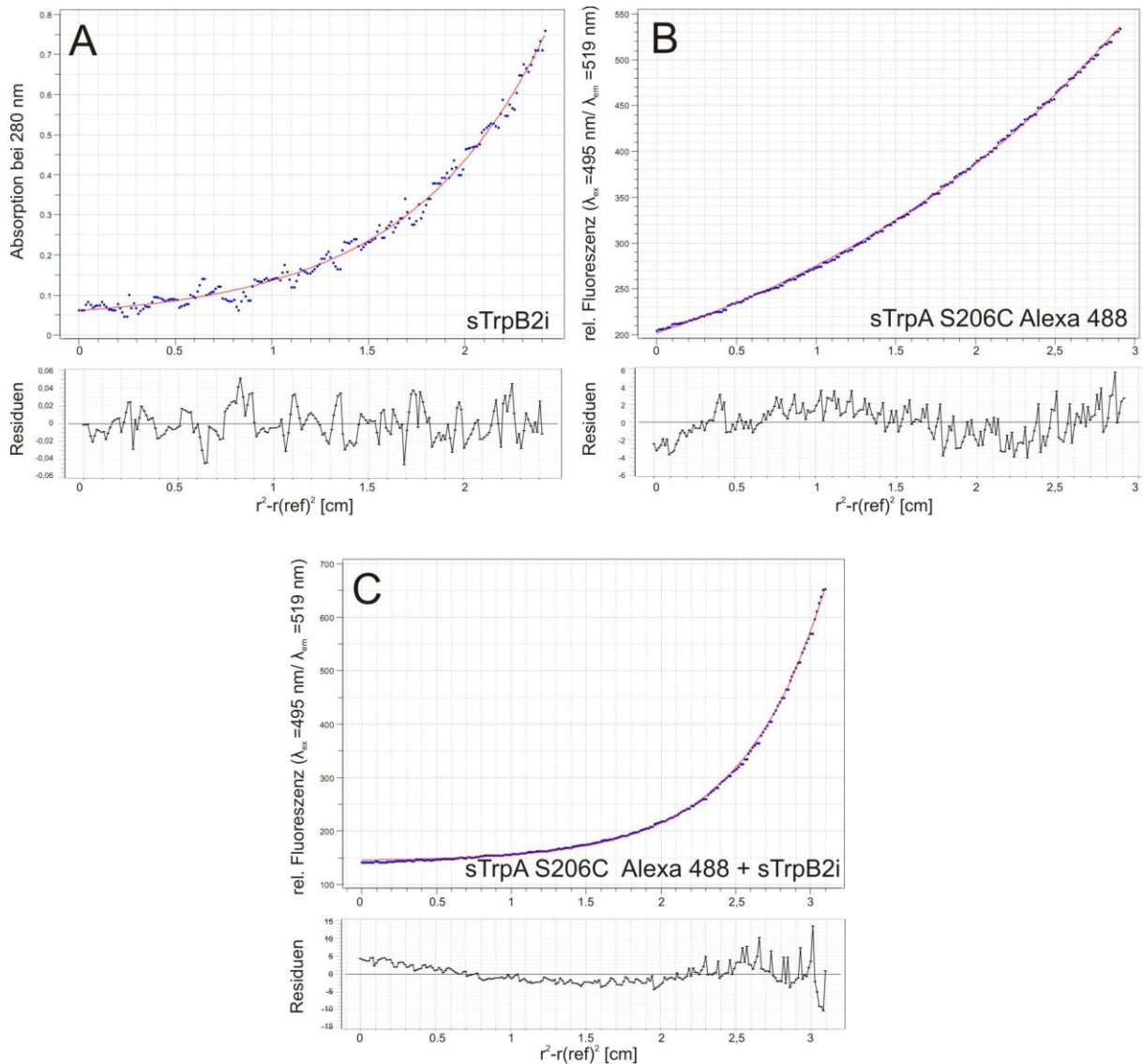


Abbildung 50: Sedimentationsgleichgewichtsanalyse von sTrpB2i, sTrpA S206C Alexa 488 und einer Mischung der beiden Proteine, jeweils in Anwesenheit von GP und Serin.

Gezeigt ist die Konzentrationsverteilung der Proteine, aufgetragen als Absorption bzw. Fluoreszenz gegen die Radialposition. Die roten Linien stellen das Ergebnis der Anpassung eines 1-Komponenten Modells an die Datenpunkte dar, darunter sind die Residuen der *fits* aufgetragen. A Konzentrationsverteilung für 4 μM sTrpB2i, die Zentrifugation erfolgte bei 16000 Upm, 4 $^\circ\text{C}$, die Detektion durch Absorptionsmessung bei 280 nm. B Konzentrationsverteilung für 500 nM sTrpA S206C Alexa488, die Zentrifugation erfolgte bei 18000 Upm, 10 $^\circ\text{C}$, die Detektion durch Messung der Fluoreszenzemission ($\lambda_{\text{ex}}=495$ nm, $\lambda_{\text{em}}=519$ nm). C Konzentrationsverteilung für eine Mischung aus 500 nM sTrpA S206C Alexa488 und 9 μM sTrpB2i, die Zentrifugation erfolgte bei 13000 Upm, 23 $^\circ\text{C}$, die Detektion durch Messung der Fluoreszenzemission ($\lambda_{\text{ex}}=495$ nm, $\lambda_{\text{em}}=519$ nm). Experimentelle Bedingungen: In allen Experimenten wurde 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Ser, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid als Puffer verwendet, für den eine Dichte von 1,02 g/ml bestimmt wurde. Für das spezifische Volumen wurde auf Basis der Aminosäuresequenzen mit dem Programm Ultrascan die Werte 0,7568 ml/g für sTrpA und 0,7439 ml/g für sTrpB2i bestimmt. Weitere Einzelheiten der Durchführung und Auswertung sind in Kapitel 3.5.10.2 beschrieben.

Um eine exakte Bestimmung des Molekulargewichts des Komplexes zu erreichen und um auszuschließen, dass mehrere Spezies vorliegen, wurde eine globale Analyse von jeweils 5 Scans mit zwei unterschiedlichen Drehzahlen (13000 und 18000 Upm) und unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (500 nM fluoreszenzmarkiertes sTrpA mit 3, 6 und

9 μM sTrpB2i) durchgeführt. Aufgrund einer optischen Verfälschung wegen der Krümmung des Bodens der Messzelle (mündliche Mitteilung Dr. K. Richter), wurde die Auswertung nur in einem Radialabstand zwischen 6,65 und 6,9 cm zum Rotorzentrum durchgeführt.

Für die isolierten sTrpA S206C Alexa488 und sTrpB2i Proteine wurden in Anwesenheit der Liganden GP und Serin Molekulargewichte von 23,8 bzw. 89,0 kDa ermittelt. Diese stimmen wie erwartet gut mit den berechneten molaren Massen für das α -Monomer von 28,0 kDa und dem $\beta\beta$ -Dimer von 95,4 kDa überein. Die globale Analyse der Gleichgewichtsläufe mit Mischungen beider Proteine bei unterschiedlichen Drehzahlen lieferten je nach Überschuss von sTrpB2i leicht unterschiedliche Ergebnisse. So wurde für die Mischung von 500 nM sTrpA S206C Alexa 488 mit 3 μM sTrpB2i ein Molekulargewicht von $107,8 \pm 0,02$ kDa, für die Mischung mit 6 μM sTrpB2i ein Molekulargewicht von $113,2 \pm 0,008$ kDa und für die Mischung mit 9 μM sTrpB2i ein Molekulargewicht von $116,5 \pm 0,04$ kDa ermittelt. Die leichte Zunahme des Molekulargewichts ist durch die relativ geringe Affinität des Proteinkomplexes zu erklären. So liegt bei einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment mit einer Mischung aus 500 nM sTrpA S206C Alexa 488 und 3 μM sTrpB2i noch 10 % des sTrpA unkomplexiert vor (Abbildung 35). Mittels der aus diesem Sedimentationsexperiment bestimmten Dissoziationskonstante von 300-400 nM für einen $\alpha\beta\beta$ Komplex lässt sich berechnen, dass bei einer Mischung aus 500 nM sTrpA und 9 μM sTrpB2i etwa 97 % von sTrpA als Komplex vorliegen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der Wert von 116,5 kDa nur sehr wenig durch nicht komplexiertes sTrpA verfälscht wurde. Da die theoretischen Molekulargewichte von $\alpha\beta$, $\alpha\beta\beta$ und $\alpha\beta\beta\alpha$ jeweils 75,1, 122,8 und 150,2 kDa betragen, lässt sich aus diesem Ergebnis für sTrpA und sTrpB2i ein $\alpha\beta\beta$ Komplex ableiten. Dies steht in Einklang mit der über ITC (Abbildung 45) und densitometrische Untersuchungen (Abbildung 49) ermittelten Stöchiometrie.

Aufgrund des identischen Sedimentationsverhaltens aller durch die verschiedenen Liganden induzierten Komplexe (Abbildung 37) muss davon ausgegangen werden, dass diese Stöchiometrie während des gesamten Katalysezyklus des Tryptophan Synthase Komplexes aus *S. solfataricus* vorliegt.

Legt man als untere Nachweisgrenze des $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplexes in Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen 0,5 % des gesamten sTrpA S206C Alexa 488 zugrunde und geht davon aus, dass in Abbildung 35 B $\alpha_n\beta_n$ als Ganzes $\alpha\beta\beta$ repräsentiert, dann kann unter Annahme eines $K_D^1(\beta\beta + \alpha \rightleftharpoons \alpha\beta\beta)$ von 318 nM eine Untergrenze für die Dissoziationskonstante $K_D^2(\alpha\beta\beta + \alpha \rightleftharpoons \alpha\beta\beta\alpha)$ von mindestens 11 μM angegeben werden, was einem Verhältnis K_D^2 / K_D^1 von 35 entsprechen würde. Über Formel 9 (Lane, 1982) lässt sich damit der Hill Koeffizient n_H , welcher ein Maß für die Kooperativität der Bindung darstellt, auf einen Höchstwert von 0,29 berechnen, wobei $n_H > 1$ positive und $n_H < 1$ negative Kooperativität beschreibt.

Formel 9: Berechnung des Hill Koeffizienten n_H nach Lane (1982).

$$n_H = \frac{2}{1 + \sqrt{K_D^2 / K_D^1}}$$

4.1.4.3 Assoziationsverhalten von sTrpA und sTrpB2i bei physiologischen Temperaturen

Es stellt sich die Frage, ob die beobachtete transiente Interaktion zwischen sTrpA und sTrpB2i ein Effekt ist, der nur bei den unphysiologisch niedrigen Temperaturen der *in vitro* Experimente von 4 bis 25 °C auftritt, während die Wachstumstemperatur von *S. solfataricus* um 80 °C liegt. Schon Leopoldseder et al. (2006) haben untersucht, ob eine stabile Komplexbildung zwischen sTrpA und sTrpB2i bei hohen, d. h. für die Enzyme physiologischen, Temperaturen stattfindet. Dazu wurde über Arrhenius Diagramme die Temperaturabhängigkeit der Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2i untersucht. Es zeigte sich, dass diese Aktivierung im untersuchten Temperaturbereich von 30 bis 60 °C gleich stark war. Um eine direktere Untersuchung des Assoziationsverhaltens der beiden Proteine bei erhöhten Temperaturen zu ermöglichen, wurden Gelfiltrationsexperimente mit in Säulenöfen genau temperierten Säulen durchgeführt, wobei die beiden den Komplex bei Raumtemperatur induzierenden Liganden GP und Serin weggelassen wurden. Es zeigte sich, dass auch bei physiologischen Temperaturen ohne diese Liganden keine Komplexbildung stattfand (Daten nicht gezeigt). Auch eine zusätzliche Absenkung des pH-Werts auf 6,0, einem Wert, der wohl auch im Cytosol von *S. solfataricus* vorliegt (Moll & Schäfer, 1988), führte zu keiner detektierbaren Assoziation der beiden Proteine (Abbildung 51).

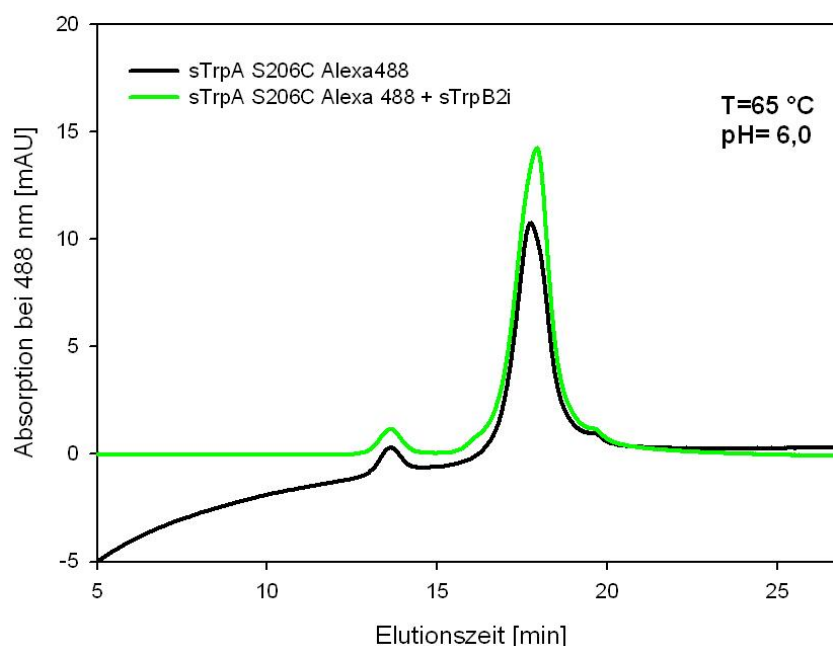


Abbildung 51: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen sTrpB2i und sTrpA S206C Alexa 488 bei 65 °C und pH 6,0 in Abwesenheit von Liganden.

Elutionsprofile von 3 μM sTrpA S206C Alexa 488 alleine (schwarz) und mit 20 μM sTrpB2i (grün). Die Elution wurde bei 65 °C und einer Flussrate von 0,6 ml/min in 10 mM KP Puffer, pH 6,0, 100 mM KCl, 0,05 % Natriumazid auf einer LKB TSK 3000 SW Säule durchgeführt, und über Alexa-spezifische Absorptionsmessung bei 488 nm verfolgt. Die Säulentemperatur wurde über einen Säulenofen konstant gehalten.

Offensichtlich ist auch bei hohen Temperaturen die Anwesenheit von Liganden zwingend für die Bildung des Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i erforderlich.

4.1.4.4 Stabilität des Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i in einem löslichen Rohextrakt

Protein-Protein Komplexe, die in Abhängigkeit des physiologischen Zustands oder der Umgebung leicht assoziieren und dissoziieren, haben oft wichtige Funktionen bei biologischen Prozessen inne (Nooren & Thornton, 2003b). Ein Beispiel ist das transiente, ligandenabhängige Assoziationsverhalten von GTPasen und Nukleotidaustauschfaktoren, wie es z. B. bei der Interaktion zwischen Ran und RanBP2, einem putativen Regulator des Kernexports beobachtet wird. Die Dissoziationskonstante der beiden Proteine ändert sich hierbei um den Faktor 10^4 bei GTP/GDP Austausch (Vetter et al., 1999). Es stellt sich die Frage, ob die Interaktion zwischen sTrpA und sTrpB2i auch *in vivo* eine starke Abhängigkeit von der Anwesenheit von Liganden zeigt, oder ob die Interaktion durch andere Faktoren, z. B. weitere Protein-Protein Interaktionen mit noch unbekannten Partnern, dauerhaft stabilisiert wird. In Co-Immunpräzipitationsexperimenten mit anti-TrpB1 und anti-sTrpB2i Antikörpern und entsprechenden Zellextrakten aus *T. maritima* und *S. solfataricus* konnte in keinem Fall ein $\alpha_n\beta_n$ Komplex sauber nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Analyse des

Assoziationszustands von Tryptophan Synthasen wurde deshalb ein Verfahren verwendet, bei dem Gesamtproteinextrakte über analytische Gelfiltration aufgetrennt, und die fraktionierten Proben anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern analysiert wurden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es nicht-invasiv ist, d.h. im Lysat vorhandene Komplexe können auf der Gelfiltrationssäule wandern, ohne dass während der Chromatographie eine Störung der Komplexbildung, z.B. durch bindende Antikörper stattfinden könnte. Durch den Vergleich des Laufverhaltens mit dem zugesetzten internen Standard, also entweder heterolog exprimiertem tmTrpB1 oder sTrpB2i, sollte beurteilt werden, ob das Protein an einen Partner gebunden ist, oder nicht.

Zur Evaluierung des Verfahrens und der Auflösung der Trennmethode wurde zuerst rekombinant exprimiertes tmTrpB1 in An -und Abwesenheit von tmTrpA über Gelfiltration aufgetrennt (3.5.9) und die Fraktionen über Dot Blot Analyse mit anti-tmTrpB1 Antikörper untersucht (3.5.7) (Abbildung 52).

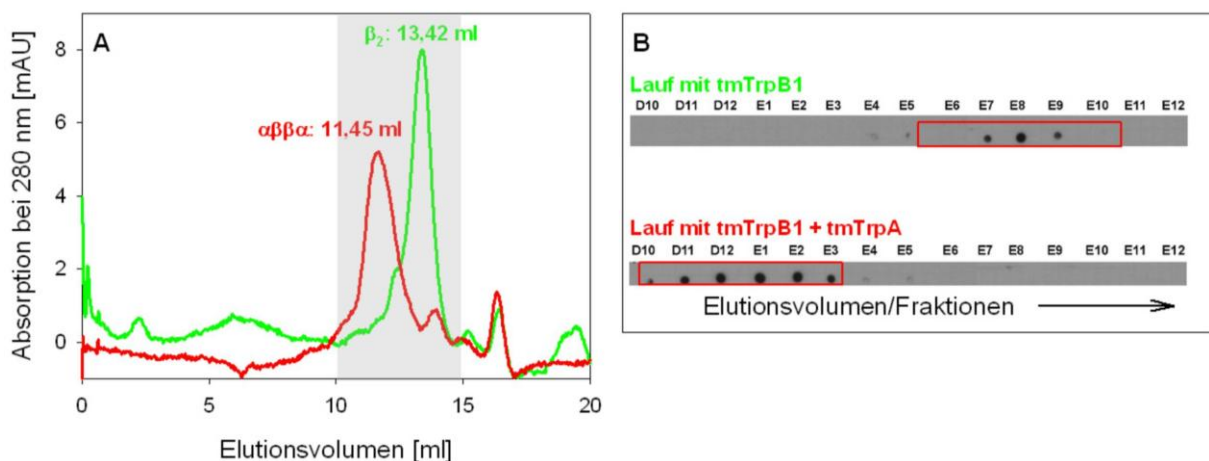


Abbildung 52: Detektion der Komplexbildung von tmTrpA und tmTrpB1 nach analytischer Gelfiltration über Immunodetektion mit anti-tmTrpB1 Antikörpern.

A Elutionsprofil von Gelfiltrationsläufen von 500 nM tmTrpB1 (500 µl, grün) bzw. 500 µl einer Mischung aus 500 nM tmTrpB1 und 600 nM tmTrpA (rot). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min in 50 mM KP Puffer, pH 7,5, 300 mM KCl auf einer Superose 12 10/300 GL Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Es wurden jeweils Fraktionen von 0,25 ml gesammelt. **B** Analyse der gesammelten Fraktionen, die in A grau hinterlegt sind, über Immunodetektion mit anti-tmTrpB1 Antikörper. Es wurden je 5 µl der 1:10 verdünnten Fraktionen auf den Dot Blot aufgebracht und wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben analysiert. Die roten Markierungen heben die Hauptfraktionen von tmTrpB1 hervor.

Die durch die Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen verursachte Verschiebung des Haupt-*peaks* um ~2 ml konnte sowohl spektroskopisch (Abbildung 52 A) als auch mittels Immunodetektion im anti-tmTrpB1 Dot Blot (Abbildung 52 B) nachgewiesen werden. Die Auflösung der Trennmethode und die Nachweisempfindlichkeit des Antikörpers waren somit ausreichend.

Daraufhin wurde das Experiment mit löslichen Zellextrakten aus *T. maritima* (Herstellung siehe 3.4.1.3) und rekombinant hergestelltem tmTrpB1 als internem Standard durchgeführt.

Für dieses Experiment wurde sowohl der unbehandelte, lösliche Zellextrakt, als auch ein über Anionenaustauscherchromatographie (3.4.2.3) vorgereinigter, löslicher Zellextrakt verwendet. Letzterer diente zur Anreicherung des gesuchten Komplexes, um auch die Integrität von schwach affinen Protein-Protein-Wechselwirkungen mit hohen Dissoziationskonstanten während der anschließenden Gelfiltration zu erhalten. Für den hier als Referenz untersuchten Komplex aus tmTrpA und tmTrpB1 Komplex mit einer Dissoziationskonstante im nM-Bereich (Abbildung 42 und Abbildung 43) spielte dies allerdings keine Rolle und entsprechend lieferten beide Zellextrakte identische Ergebnisse. Abbildung 53 zeigt den Nachweis des Tryptophan Synthase Komplexes nach Gelfiltration des vorgereinigten Zellextrakts, wobei wiederum Immunodetektion mit Hilfe von anti-tmTrpB1 Antikörpern zur Anwendung kam.

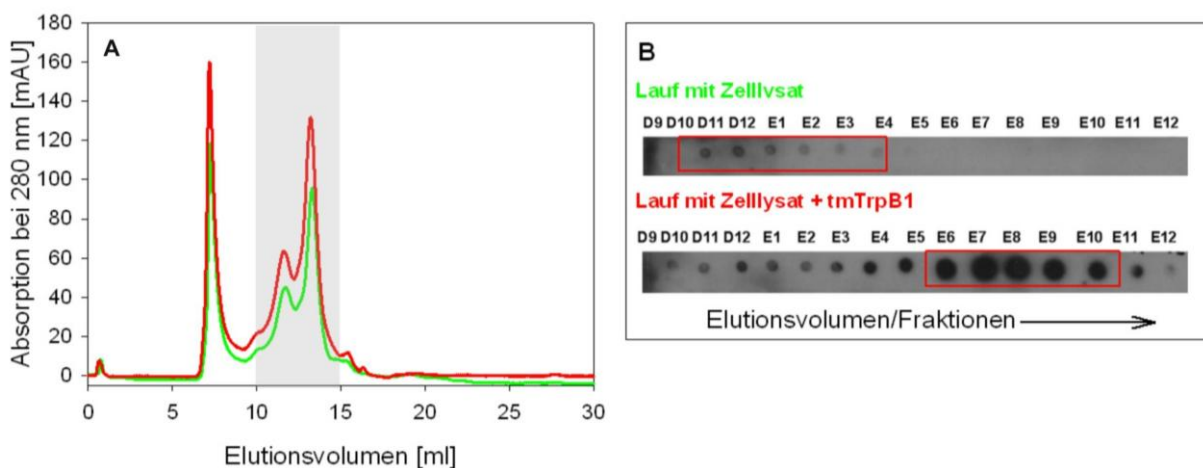


Abbildung 53: Analytische Gelfiltration zum Nachweis des nativen Tryptophan Synthase Komplexes in löslichen Zellextrakten aus *T. maritima*.

A Elutionsprofile von Gelfiltrationsläufen von 500 µl Extrakt mit 900 µg Protein aus *T. maritima* (grün) bzw. 500 µl einer Mischung aus 900 µg Proteinextrakt und 1,5 µM (35 µg) rekombinant hergestelltem tmTrpB1 (rot). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 50 mM KP Puffer, pH 7,5, 300 mM KCl als Laufmittel auf einer Superose 12 10/300 GL Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Es wurden jeweils Fraktionen von 0,25 ml gesammelt. Die Extrakte wurden für dieses Experiment über Anionenaustauscherchromatographie vorgereinigt (3.4.2.3). **B** Analyse der gesammelten Fraktionen, die in A grau hinterlegt sind, über Immunodetektion mit anti-tmTrpB1 Antikörper. Es wurden je 5 µl der 1:12 (Lauf ohne internen Standard) bzw. 1:35 (Lauf mit internem Standard) verdünnten Fraktionen auf den Dot Blot aufgebracht und wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben analysiert. Die roten Markierungen heben die Hauptfraktionen von tmTrpB1 hervor.

Die Überlagerung der Elutionsprofile der beiden Gelfiltrationsläufe (Abbildung 53 A) belegt die Identität der chromatographischen Auftrennung mit und ohne rekombinantem tmTrpB1. Der Vergleich des tmTrpB1 Gehalts der jeweiligen Fraktionen beider Läufe (Abbildung 53 B) zeigt, dass der zugesetzte interne tmTrpB1 Standard um ca. 2 ml später eluiert, als das zelluläre tmTrpB1. Diese mit dem Experiment in Abbildung 52 vergleichbare Verschiebung lässt schließen, dass die Tryptophan Synthase in *T. maritima* auch *in vivo* in Form des $\alpha\beta\alpha$

Komplexes vorliegt, der für die rekombinanten tmTrpA und tmTrpB1 Proteine gefunden wurde (Hettwer & Sterner, 2002).

Um eine Aussage über den *in vivo* Assoziationszustand der Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* zu erhalten, wurde das Experiment in analoger Weise mit einem löslichen Zellextrakt und rekombinant hergestelltem sTrpB2i als internem Standard durchgeführt (Abbildung 54).

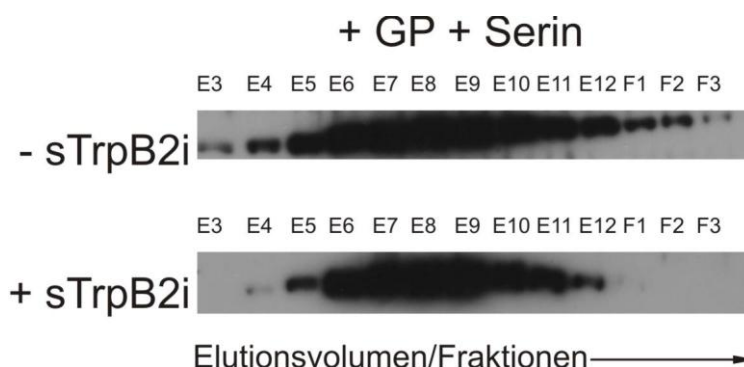


Abbildung 54: Versuchter Nachweis des nativen Tryptophan Synthase Komplexes in löslichen Zellextrakten aus *S. solfataricus*.

Analog zu Abbildung 53 wurden Zellextrakte aus *S. solfataricus* (Herstellung siehe 3.4.1.3) in An- und Abwesenheit von rekombinant hergestelltem sTrpB2i einer Gelfiltration unterzogen. Dazu wurden je 300 μ l Extrakt mit 900 μ g Protein in An- oder Abwesenheit von 0,5 μ M (8 μ g) rekombinantem sTrpB2i und den komplexinduzierenden Liganden GP und Serin chromatographisch getrennt. Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 10 mM KP, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 60 mM *rac* GP, 0,05 % Natriumazid als Laufmittel auf einer Superose 12 10/300 GL Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Es wurden jeweils Fraktionen von 0,25 ml gesammelt. Beide Läufe zeigten nahezu identische Elutionsprofile und sind nicht gezeigt. Dargestellt ist die Analyse der gesammelten Fraktionen über Immunodetektion mit anti-sTrpB2i Antikörper. Es wurden je 10 μ l der Fraktionen mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf den Western Blot aufgebracht und wie in Kapitel 3.5.6 beschrieben analysiert. Im hier nicht gezeigten Teil des Blots fanden sich keine Hinweise auf Kreuzreaktion des Antikörpers.

Die Bestimmung der sTrpB2i Menge in den einzelnen Fraktionen der beiden Gelfiltrationsläufe zeigt, dass das zelluläre sTrpB2i (oben) gleichzeitig mit dem als internen Standard zugesetzten rekombinanten sTrpB2i (unten) eluiert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass das zelluläre sTrpB2i unter diesen Bedingungen nicht mit sTrpA assoziiert ist, obwohl die den Komplex induzierenden Liganden GP und Serin verfügbar waren. Auch eine Assoziation mit weiteren Proteinen aus dem Zellextrakt kann somit ausgeschlossen werden. Es kann angenommen werden, dass die fehlende Komplexbildung auf die geringe Affinität zwischen sTrpA und sTrpB2i (abhängig vom Messverfahren wurde eine Dissoziationskonstante zwischen 300 bis 1800 nM ermittelt, siehe Kapitel 4.1.4.2) zurückzuführen ist. Deshalb wurde das Experiment wiederholt, wobei statt sTrpB2i als interner Standard rekombinantes sTrpA zugesetzt wurde. Durch die so erhöhte sTrpA Konzentration im Zellextrakt sollte die Komplexbildung des zellulären sTrpB2i vorangetrieben werden. Das Experiment wurde in Anwesenheit der Liganden GP und Serin bzw. von Serin alleine durchgeführt. Dadurch sollte untersucht werden, ob im zellulären Milieu andere

Liganden oder auch Proteine vorhanden sind, die die Komplexbildung ohne GP ermöglichen. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 55 gezeigt.

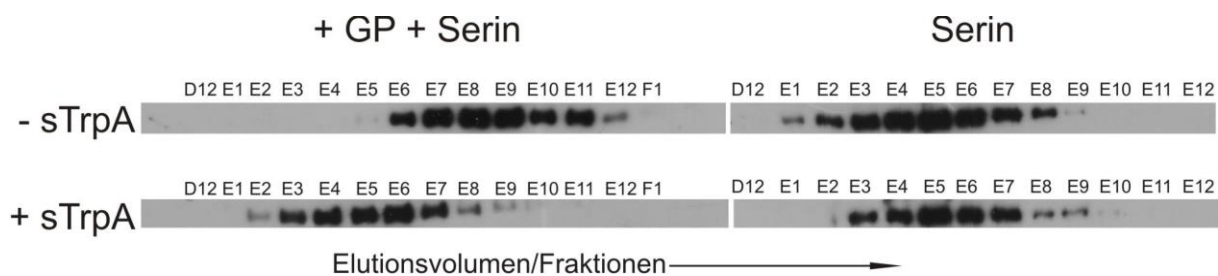


Abbildung 55: Nachweis eines Tryptophan Synthase Komplexes in löslichen Zellextrakten aus *S. solfataricus* in An- und Abwesenheit von zugesetztem, rekombinantem sTrpA.

Das Experiment wurde wie in der Legende zu Abbildung 54 beschrieben durchgeführt, jedoch wurden 1 μ M rekombinantes sTrpA zugegeben (untere Spuren), sowie die Komplexbildung auch ohne GP analysiert (rechte Spuren).

Die Zugabe von zusätzlichem, rekombinanten sTrpA induziert in Anwesenheit der Liganden GP und Serin eine deutliche frühere Elution (~ 1 ml) des zellulären sTrpB2i. Diese Verschiebung kann nur durch die Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen erklärt werden. In Abwesenheit von GP ist diese Verschiebung nicht zu beobachten. Dies steht in Einklang mit den Gelfiltrations- und Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten mit den gereinigten Proteinen (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 35), bei denen eine Komplexbildung nur in Anwesenheit beider Liganden detektierbar war.

Auffallend ist, dass das zelluläre sTrpB2i in Abwesenheit von GP eine deutlich frühere Elution (Abbildung 55 rechts, Hauptfraktion E5) zeigt, als in Anwesenheit von GP (Abbildung 55 links, Hauptfraktionen E8 und E9, auch in Abbildung 54). Es kann nicht beurteilt werden, ob diese Verschiebung auf die unterschiedlichen chromatographischen Bedingungen (die Elutionszeit von Proteinen hängt auch vom Laufmittel ab und in früheren Experimenten wurde deutlich, dass GP im Laufpuffer die Elutionszeit des isolierten sTrpB2i Proteins verändert) zurückzuführen ist, oder ob im Zellextrakt tatsächlich in Abwesenheit von GP komplexiertes sTrpB2i vorliegt. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass der Zusatz von rekombinantem sTrpA zu keiner weiteren Verschiebung führt (Abbildung 55 rechts unten), da das gesamte zelluläre sTrpB2i bereits mit einem Interaktionspartner (zelluläres sTrpA mit einem unbekannten Liganden oder ein anderes Protein) abgesättigt ist. Dies würde allerdings bedeuten, dass GP in Abwesenheit von zugesetztem sTrpA (Abbildung 55 links oben) die Dissoziation dieses Komplexes induzieren würde. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, sollte das Experiment von Abbildung 54 in Abwesenheit von GP wiederholt werden. Liegt zelluläres sTrpB2i tatsächlich in Abwesenheit von GP als Komplex mit einem weiteren Protein vor, so sollte dieser Komplex früher eluieren, als das im Überschuss zugesetzte, rekombinante sTrpB2i.

Unter der Annahme, dass dieses Verhalten auf die unterschiedlichen chromatographischen Bedingungen und nicht auf die zuletzt beschriebene Konstellation zurückzuführen ist, lassen sich aus den durchgeführten Experimenten folgende Schlussfolgerungen ziehen: In Anwesenheit von GP und Serin ist im Zellextrakt kein Komplex zwischen sTrpB2i und sTrpA oder einem anderen Protein detektierbar. Dies ist auf die niedrige Affinität zwischen sTrpA und sTrpB2i zurückzuführen, da die Zugabe von rekombinant exprimiertem sTrpA die Komplexbildung induziert. Diese ist, genau wie bei den *in vitro* Experimenten mit den gereinigten, rekombinanten Proteinen, abhängig von der Anwesenheit von GP und Serin. Daraus lässt sich folgern, dass auch *in vivo* die Interaktion zwischen sTrpA und sTrpB2i transienter Natur ist und nur durch die Bindung von Liganden an beiden Proteinen stabilisiert wird. Zeigt das noch durchzuführende, oben genannte Experiment in Abwesenheit von GP gleiches Laufverhalten für zelluläres und rekombinantes sTrpB2i, so geben die Experimente mit Zellextrakten keinen Hinweis auf Bildung höherer, hochaffiner Komplexe unter Beteiligung weiterer Proteine.

4.1.5 Röntgenkristallstruktur des Komplexes aus sTrpA und sTrpB2i

In Kooperation mit Prof. Olga Mayans (Universität Liverpool) wurden sTrpA, sTrpB2a und ein Komplex von sTrpA und sTrpB2i (in Anwesenheit von GP und Serin) kristallisiert. Für alle Proteine konnten Röntgenstrukturen erhalten werden. Die Struktur des Komplexes wird im Augenblick noch verfeinert und sollte in Kürze verfügbar sein. Über die Strukturen soll zum einen die Fragestellung untersucht werden, welche Konformationsänderungen bei Ligandenbindung die Assoziation von sTrpA und sTrpB2i ermöglichen und worin sich dieser Komplex von den kanonischen Tryptophan Synthasen unterscheidet. Außerdem soll die Struktur von sTrpB2i mit der von sTrpB2a verglichen werden. Letzteres zeigt keine physikalische oder funktionale Interaktion mit sTrpA und hat wahrscheinlich eine andere, noch unbekannte, Funktion als die Biosynthese von Tryptophan.

4.1.6 Abschließende Diskussion: Der transiente $\alpha\beta\beta$ Komplex aus sTrpB2i und sTrpA

Für die kanonischen Tryptophan Synthasen aus *E. coli* und *S. typhimurium* ist eine Abhängigkeit der Affinität der TrpA und TrpB1 Untereinheiten von der Anwesenheit verschiedener Liganden beschrieben. Im Falle der Enzyme aus *E. coli* wurden *stopped flow* Messungen bei 25 °C durchgeführt (Lane et al., 1984). Die aus den Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation und Dissoziation abgeleitete thermodynamische Dissoziationskonstante betrug in Abwesenheit von Liganden etwa 0,45 nM, in Anwesenheit von IPP etwa 0,06 nM und in Anwesenheit von Serin etwa 0,0015 nM, was einer

ligandeninduzierten Zunahme der Affinität der TrpA und TrpB1 Untereinheiten um eine (IPP) bzw. zwei (Serin) Größenordnungen entspricht. Über die Messung der wechselseitigen Aktivierung von TrpA und TrpB1 aus *E. coli* konnte die Abhängigkeit der Dissoziationskonstante von IGP und wiederum Serin bei 37 °C abgeschätzt werden (Creighton & Yanofsky, 1966). In Anwesenheit von IGP wurde ein apparenter K_D Wert von 250 nM, in Anwesenheit von Serin ein Wert von 31 nM (1,25 nM in Gegenwart von 0,1 M NaCl) und in der Anwesenheit beider Substrate ein Wert von 1,85 nM (0,38 nM in Gegenwart von 0,1 M NaCl) ermittelt. Die über isothermische Titrationskalorimetrie bei 37 °C in Abwesenheit von Liganden gemessene Dissoziationskonstante betrug 131 nM (Ogasahara et al., 2003). Trotz unterschiedlicher Messverfahren und zum Teil unterschiedlicher Temperaturen und Pufferbedingungen belegen diese Ergebnisse eine Steigerung der Affinität von *E. coli* TrpA und TrpB1 in Anwesenheit ihrer Liganden.

Die in der vorliegenden Arbeit und durch Leopoldseder et. al (2006) erhaltenen experimentellen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Affinität der sTrpA und sTrpB2i Untereinheiten im Tryptophan Synthase Komplex aus *S. solfataricus* in wesentlich stärkerem Maße von der Bindung von Liganden abhängt. So konnte in Abwesenheit von Liganden über Gelfiltrationschromatographie und Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe auch bei mikromolaren Konzentrationen beider Proteine kein stabiler Komplex nachgewiesen werden. Trotzdem erhöht sTrpB2i die katalytische Aktivität von sTrpA in *steady-state* enzymkinetischen Messungen bis zu 300-fach. Die über die entsprechende Aktivitätstitration bei 65 °C ermittelte apparente Dissoziationskonstante in Anwesenheit von IGP und Serin für den Komplex aus sTrpA und sTrpB2i von 280 nM ist jedoch deutlich höher als in vergleichbaren Messungen mit den Tryptophan Synthasen aus *T. maritima* (4 nM) und *E. coli* (1,85 nM) (Creighton & Yanofsky, 1966; Leopoldseder et al., 2006). Ohne Serin steigt die apparente Dissoziationskonstante in Aktivitätstitrationen sogar auf 22 µM an.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der enzymatisch nicht umsetzbare TrpA-Ligand Glycerin-3-Phosphat (GP) und der TrpB-Ligand Serin bei Raumtemperatur einen stabilen Komplex zwischen sTrpA und sTrpB2i induzieren, wobei die Anwesenheit beider Liganden Voraussetzung für die Komplexbildung ist (4.1.4.1). Die Affinität dieser Interaktion ist, je nach verwendetem Messverfahren, durch eine Dissoziationskonstante von 300 bis 1800 nM charakterisiert. Durch Abschätzung der Nachweisgrenze an komplexiertem sTrpA in diesen Experimenten, kann eine Untergrenze für die Dissoziationskonstante in Anwesenheit von Serin und Abwesenheit von GP von ca. 600 µM angegeben werden. Der TrpA-Ligand GP erhöht somit die Affinität der sTrpA und sTrpB2i Untereinheiten mindestens 1000-fach. Die bei der Tryptophan Synthase aus *E. coli* über Aktivitätstitrationen ermittelte Affinitätssteigerung der Komplexbildung durch Zugabe des TrpA-Liganden IGP beträgt dagegen, in Anwesenheit von Serin, lediglich einen Faktor

von ~20 (Creighton & Yanofsky, 1966). In der Literatur finden sich nur wenige Protein-Protein Interaktionen, die vergleichbar stark von der Bindung von Liganden abhängen, wie die Komplexbildung aus sTrpA und sTrpB2i. Ein Beispiel stellt die Interaktionen zwischen dem in den Zellkerntransport involvierten GTP-bindenden Protein Ran und dem putativen Regulator des Kernexports RanBP2 dar. Die Dissoziationskonstante der beiden Proteine ändert sich bei GTP/GDP Austausch um den Faktor 10^4 (Vetter et al., 1999).

Der durch GP und Serin stabilisierte Komplex aus sTrpA und sTrpB2i weist eine ungewöhnliche $\alpha\beta\beta$ Stöchiometrie auf, welche auf eine stark ausgeprägte negative Kooperativität für die Bindung der zweiten TrpA Untereinheit an das $\alpha\beta_2$ Protomer hindeutet. Für die Dissoziationskonstante des zweiten Bindungsereignisses eines TrpA Moleküls an das $\alpha\beta$ Protomer wurde durch Abschätzen der Nachweisgrenze für $\alpha\beta\beta\alpha$ in Sedimentationsexperimenten (Abbildung 35 B) eine Untergrenze von 11 μM bestimmt, wobei eine Dissoziationskonstante von 300-400 nM für die Bildung von $\alpha\beta\beta$ aus α und $\beta\beta$ angenommen wurde. Daraus lässt sich ein Höchstwert für den Hill Koeffizienten n_H von 0,29 angeben. Auch bei der prototypischen Tryptophan Synthase aus *E. coli* ist neben dem $\alpha\beta\beta\alpha$ auch ein $\alpha\beta\beta$ Komplex beschrieben (Lane et al., 1984). Dieser bildet sich nach Mischung äquimolarer Konzentrationen von α und $\beta\beta$ und wandelt sich durch weitere Zugabe von α zu $\alpha\beta\beta\alpha$ um. Durch *stopped flow* Messungen in Abwesenheit von Liganden wurden Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation und Dissoziation der beiden Teilschritte bestimmt, wodurch sich thermodynamische Dissoziationskonstanten von 0,41 nM ($\beta\beta + \alpha \rightleftharpoons \alpha\beta\beta$) und 1,96 nM ($\alpha\beta\beta + \alpha \rightleftharpoons \alpha\beta\beta\alpha$) berechnen ließen, was einem Hill Koeffizienten von 0,54 entspricht. Somit zeigt die Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* eine deutlich ausgeprägtere negative Kooperativität als der Komplex aus *E. coli*. Die strukturelle Grundlage dieser starken negativen Kooperativität, die wohl auch *in vivo* zur Präponderanz der $\alpha\beta\beta$ Quartärstruktur führt, ist derzeit nicht klar. Vermutlich induziert die Bindung einer α -Untereinheit eine Konformationsänderung an der gegenüberliegenden Kontaktfläche des $\beta\beta$ -Dimers, welche die Affinität für die zweite α -Untereinheit herabsetzt. Genauere Aussagen hierüber sind aber erst nach Aufklärung der Röntgenstruktur des Komplexes möglich, die derzeit in Bearbeitung ist (4.1.5).

Durch Untersuchung des Assoziationsverhaltens in Anwesenheit unterschiedlicher Liganden (Abbildung 37) konnte gezeigt werden, dass der Komplex, zumindest partiell, nicht nur in Anwesenheit von GP, sondern auch durch das TrpA-Substratanalogon Indolacetylglycin, das Übergangszustandsanalogon 2-HGP und das Produkt Glycerinaldehyd-3-Phosphat induziert wird. In allen Fällen ist die Komplexbildung abhängig von der Anwesenheit von Serin (Abbildung 40 und Abbildung 41). Auch eine Kombination aus GP und dem zweiten TrpB-Substrat Indol führt zu einer partiellen Komplexbildung. Daraus lässt sich folgern, dass der transiente Komplex zwischen sTrpA und sTrpB2i während des gesamten Katalysezyklus der

Tryptophan Synthase (Abbildung 28) ausgebildet wird, und die Dissoziation der Untereinheiten erst nach Ablauf der Reaktion an TrpA stattfindet. Das identische Sedimentationsverhalten aller beobachteten Komplexe (Abbildung 40 und Abbildung 41) belegt, dass die untersuchte Tryptophan Synthase während der gesamten Katalyse eine $\alpha\beta\beta$ Quartärstruktur aufweist.

Das beobachtete Komplexbildungsverhalten ähnelt entfernt dem Funktionsmechanismus des Chaperonins GroEL und seinem Co-Chaperonin GroES. Diese Proteine verwenden die Energie der ATP-Hydrolyse, um Proteinfaltungsreaktionen voranzutreiben. Die GroEL Proteine, welche als ATP Hydrolasen wirken, sind rotationssymmetrische, ringförmige Oligomere, wobei zwei Ringe, der *cis* und der *trans* Ring, bestehend aus je 7 Untereinheiten, übereinander angeordnet sind und eine Doppel-Zylinder Struktur ausbilden. Die Bindung des GroES Proteins, ebenfalls ein aus 7 Untereinheiten bestehendes Oligomer, verschließt diese Zylinder, wobei sich ein vom Lösungsmittel abgeschirmter Hohlraum bildet, in dem Proteinsubstrate falten können. Die Bildung und Stabilität des GroEL-GroES Komplexes ist abhängig von der Bindung von ATP an den *cis* Ring. Die Besetzung des *cis* Rings mit ATP inhibiert die Bindung von ATP und damit von GroES an den *trans* Ring, wodurch ein asymmetrischer $[\text{GroEL}]_2\text{-}[\text{GroES}]_1$ Komplex entsteht. Die ATP-Hydrolyse am *cis* Ring ermöglicht ATP-Bindung an den *trans* Ring, wodurch GroES vom *cis* Ring dissoziiert und an den *trans* Ring bindet, wodurch der Zyklus wieder von vorne beginnt. Die Dissoziation des *cis* GroEL-GroES Komplexes ermöglicht die Freisetzung von gefalteten Substratproteinen aus dem Hohlraum von GroEL. Die negative, von der ATP-Hydrolyse abhängige, Kooperativität der Bindung von GroES an die beiden GroEL Ringe führt somit zu einer kontrollierten Substratbindung- und Freisetzung. Während des gesamten Reaktionszyklus liegt der Komplex in seiner trimeren $[\text{GroEL}]_2\text{-}[\text{GroES}]_1$ vor (Lin & Rye, 2006). Es kann spekuliert werden, dass der ausgeprägten negativen Kooperativität bei der Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* ein ähnlicher, alternierender Mechanismus der Komplexbildung zugrunde liegt, bei dem die Dissoziation der α -Untereinheit von der *cis* Untereinheit des $\beta\beta$ -Dimers durch die Assoziation einer α -Untereinheit an die *trans* Untereinheit des $\beta\beta$ -Dimers bedingt wird. Dies könnte wiederum Voraussetzung für die Freisetzung des Produkts Tryptophan aus dem aktiven Zentrum der *cis* Untereinheit von $\beta\beta$ sein, analog zur Freisetzung der gefalteten Polypeptidkette aus dem *cis* Ring von GroEL. Auf Basis der experimentellen Befunde und bekannten Eigenschaften der Tryptophan Synthase aus *S. typhimurium* (Abbildung 8) wird ein für die Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* adaptiertes Modell des Katalysezyklus vorgeschlagen, nach dem sTrpA und sTrpB2i bei Bindung der Substrate IGP und Serin eine Konformationsänderung hin zu einer teilweise geschlossenen Form durchlaufen. Diese Konformationsänderung kann bei sTrpB2i durch Änderung des Absorptionsspektrums indirekt beobachtet werden (Abbildung 30). Die

Konformationsänderungen bewirken die Ausformung des trimeren $\alpha\beta\beta$ Komplexes, der während des gesamten Katalysezyklus bestehen bleibt. Durch diesen Mechanismus wäre jeweils lediglich eine β -Untereinheit des $\alpha\beta\beta$ Komplexes während des Katalysezyklus aktiv. Bei den TrpB2 Enzymen handelt es sich um evolutionsgeschichtlich alte Enzyme, und es wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem die schrittweise Zunahme der Affinität zu TrpA von TrpB2o (keine Bindung), über TrpB2i (schwache, transiente Bindung) hin zu TrpB1 (starke, konstitutive Bindung) die Verfeinerung der funktionellen Interaktion widerspiegelt, welche mit der Co-Lokalisation der codierenden Gene im *trp* Operon einhergeht (Leopoldseder et al., 2006; Merkl, 2007). Die wenig effiziente Nutzung der vorhandenen enzymatischen Kapazitäten von TrpB2i Enzymen könnte im Laufe der Evolution durch Ausbildung des stabilen, kanonischen $\alpha\beta\beta\alpha$ Komplexes der TrpB1 Enzyme gesteigert worden sein, bei denen die negative Kooperativität für die Bildung von $\alpha\beta\beta\alpha$ aus $\alpha\beta\beta$ deutlich schwächer ausgeprägt ist (Lane et al., 1984).

Neben dem Einfluss von Liganden wurde überprüft, ob die Temperatur das Assoziationsverhalten von sTrpA und sTrpB2i verändert. Da die physiologische Wachstumstemperatur von *S. solfataricus* um 80 °C liegt, erschien die Vermutung plausibel, dass sich das Assoziationsverhalten dort von dem bei Raumtemperatur unterscheiden könnte. Beispiele für temperaturabhängiges Assoziationsverhalten findet sich bei den Chaperonen (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Die kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) sind Oligomere von 9-40 Untereinheiten, die, induziert durch einen Temperaturanstieg, dissoziieren können. Dadurch wird die Bindung von ungefalteten Proteinen ermöglicht (Haslbeck et al., 1999). Weder die Extrapolation der Temperaturabhängigkeit der Aktivierung von sTrpA durch sTrpB2i in Arrhenius Diagrammen (Leopoldseder et al., 2006), noch die Verfolgung der Komplexbildung bei 60 °C über Gelfiltrationschromatographie (4.1.4.3) lieferten jedoch Hinweise auf ein temperaturabhängiges Assoziationsverhalten. Auch die Absenkung des pH-Wertes auf 6,0, wie für das Cytosol von *S. solfataricus* abgeschätzt wurde, führte zu keiner Komplexbildung in Abwesenheit von Liganden (Abbildung 51). Durch Charakterisierung von sTrpB2i, welches aus dem natürlichen Wirtsorganismus *S. solfataricus* gereinigt wurde, konnte ausgeschlossen werden, dass das Enzym *in vivo* in seinen Komplexbildungseigenschaften durch posttranslationale Modifikationen verändert wird (4.1.2). Das Vorhandensein von den Komplex stabilisierenden Disulfidbrücken *in vivo* kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da sTrpA keine Cysteine enthält. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass natives sTrpA aus *S. solfataricus* signifikante Unterschiede zum heterolog exprimierten Protein zeigt. Dies sollte durch die Charakterisierung von sTrpA aus *S. solfataricus* analog zu sTrpB2i überprüft werden. Jedoch legt die Untersuchung des Assoziationszustands von sTrpB2i in löslichen Rohextrakten aus

S. solfataricus mittels Gelfiltrationschromatographie und Immunodetektion den Schluss nahe, das auch *in vivo* kein stabiler Komplex vorliegt, sondern, ähnlich zu den rekombinant gereinigten Proteinen, eine ligandenabhängige, transiente Interaktion stattfindet (4.1.4.4.).

Transiente Protein-Protein Interaktionen sind ein in der Zelle häufig beobachtetes Phänomen. Eine transiente Interaktion zeichnet sich im Gegensatz zu einer permanenten Interaktion, die normalerweise sehr stabil ist, dadurch aus, dass *in vivo* Assoziation und Dissoziation stattfinden können. Dabei unterscheidet man schwache, transiente Interaktionen, die durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Komplex und freien Proteinen charakterisiert sind, z.B. bei Lysin aus Spermatozoen (Shaw et al., 1995) und starken transienten Interaktionen, die einen molekularen Auslöser benötigen, um das Gleichgewicht zwischen den Oligomerisierungszuständen zu verschieben (Nooren & Thornton, 2003a). So dissoziiert beispielsweise das heterotrimere G Protein bei GTP Bindung in die $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten, aber bildet ein stabiles Trimer mit gebundenem GDP (Lambright et al., 1994). Die meisten bekannten transienten Protein-Protein Interaktionen sind Teil von Signalübertragungswegen (Nooren & Thornton, 2003b), so z.B. RhoA/PKN/PRK1 (Effektoren, die Cytoskelettkomponenten phosphorylieren), Ran/RCC1 (Guanin Nukleotid Austauschfaktor, beeinflusst den Ablauf des Zellzyklus) oder bovines Transducin α / Transducin $\beta\gamma$ (Modulator von verschiedenen Signaltransduktionskaskaden) (Lambright et al., 1994; Maesaki et al., 1999; Renault et al., 2001). Auch bei vielen Chaperonen sind transiente, an ATP/ADP Austausche gekoppelte, Interaktionen mit Substratproteinen Teil des Chaperonzyklus, so z. B. bei DnaK, einem Hsp70 Protein aus *E. coli* (Mayer & Bukau, 2005). Bei Enzymen treten transiente Wechselwirkungen hauptsächlich bei schnellen Elektronentransferreaktionen auf, so z. B. bei der Interaktion zwischen der Ferredoxin:NADP⁺:Reduktase (FNR) und Ferredoxin (Fd) als Teil der Lichtreaktionen der Photosynthese (Morales et al., 2000). Aus der Kristallstruktur des Komplexes lässt sich ableiten, dass FNR und Fd vor jedem Elektronentransfer assoziieren und aufgrund einer redox-gekoppelten Konformationsänderung von Fd wieder dissoziieren. Auch die enzymkinetischen Daten der Glutamin Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase (PRPP-AT) und der Glycinamide Ribonukleotid Synthetase (GAR-syn) zeigen eine funktionelle Interaktion zwischen den beiden Enzymen, ohne das ein stabiler Komplex über Methoden wie Gelfiltrationschromatographie, Fluoreszenzspektroskopie, Crosslinking oder *pull-down* Assays detektiert werden konnte (Rudolph & Stubbe, 1995).

Es stellt sich die Frage, was die physiologische Funktion der transienten Interaktion der Untereinheiten der Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* ist. Eine mögliche Erklärung für das ungewöhnliche, ligandenabhängige Assoziationsverhalten wäre, dass eines der beiden Proteine eine zweite, noch unbekannte enzymatische Reaktion katalysiert. Die Experimente

mit Zellextrakten aus *S. solfataricus* deuten darauf hin, dass sTrpB2i *in vivo* in Abwesenheit des Liganden GP möglicherweise mit einem anderen Protein assoziiert ist. Erst durch Verdrängung durch sTrpA mit gebundenem GP (oder dem Substrat IGP) würde dieses Protein abdissoziieren und der ligandenabhängige Tryptophan Synthase Komplex gebildet werden (Abbildung 55). Die Suche nach diesem möglichen alternativen Interaktionspartner von sTrpB2i ist vermutlich arbeitsintensiv und mit ungewissem Ausgang, könnte jedoch im Erfolgsfall sehr interessante neue Einsichten ermöglichen..

Betrachtet man die Affinitäten von sTrpA und sTrpB2i für ihre Substrate, so fällt auf, dass sTrpA IGP mit einer Dissoziationskonstante von 59 nM hoch affin bindet (Abbildung 39). Aufgrund der niedrigen Umsatzzahl von $0,0007\text{ s}^{-1}$ des isolierten sTrpA Enzyms bei 60 °C (Leopoldseder et al., 2006) kann davon ausgegangen werden, dass *in vivo* das Enzym zwar einen hohen Sättigungsgrad mit IGP aufweist, dieses aber ohne die bis zu 140-fache Aktivierung durch gebundenes sTrpB2i nur sehr langsam Indol und GA3P umsetzen kann. Die Bindung von sTrpB2i an sTrpA ist allerdings in hohem Maße vom Sättigungsgrad mit Serin abhängig (4.1.4), wobei der K_M -Wert von isoliertem und komplexiertem sTrpB2i bei 7 mM liegt (Tabelle 7 und 8 im Anhang). Die cytosolische Konzentration von Serin in *S. solfataricus* ist nicht bekannt, allerdings sind für *E. coli* über einen massenspektrometrischen Ansatz Absolutkonzentrationen von 68 bis 150 μM bestimmt worden (Bennett et al., 2009). Wird dieser Konzentrationsbereich auch für das Cytosol von *S. solfataricus* angenommen, muss davon ausgegangen werden, dass das Komplexbildungsverhalten von sTrpB2i und damit die Aktivität des Tryptophan Synthase Komplexes *in vivo* hauptsächlich durch die Konzentration von freiem Serin bestimmt wird. Es wird vorgeschlagen, dass die stark ligandenabhängige Interaktion der Tryptophan Synthase in *S. solfataricus* eine Kopplung der Tryptophan Biosynthese an den Serin-Metabolismus darstellt. L-Serin dient nicht nur der Synthese von Tryptophan und als Baustein der Protein-Biosynthese, sondern auch als Vorstufe für die Synthese verschiedener weiterer Zellbausteine. So wird es für die Bildung von Glycin, Cystein, Selenocystein sowie Methionin benötigt (Brown et al., 1990; Landi et al., 1966; Ravnikar & Somerville, 1987; Sawers, 1998). Darüber hinaus ist Serin in die Biosynthese von Phospholipiden (Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin), Sphingolipiden, Ceramiden (Florin-Christensen et al., 1995) und in die Synthese von Purinen (de Koning et al., 2003) involviert. Möglicherweise ist diese regulatorische Kopplung von Serin -und Tryptophan Metabolismus aus noch unbekannten Gründen vorteilhaft für *S. solfataricus* und andere Crenarchaeota, die in vielen Fällen ein Operon-ständiges *trpB2i* Gen aufweisen (Merkl, 2007).

4.2 Funktionsuntersuchungen an TrpB2o

Wie bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben, wurde vor kurzem zusätzlich zu den lange bekannten TrpB1 Proteinen die neue Klasse der TrpB2 Proteine identifiziert. TrpB1 und TrpB2 Proteine stellen zwei verwandte, aber phylogenetisch unterscheidbare Sequenzfamilien dar (Xie et al., 2002).

Die meisten Prokaryoten, wie z. B. *E. coli*, weisen ein einzelnes *trpB1* Gen auf. Jedoch findet man in vielen bakteriellen und archaeellen Genomen sowohl ein *trpB1* als auch ein *trpB2* Gen. Darüber hinaus findet man in einigen Spezies eines oder zwei *trpB2* Gene, aber kein *trpB1* Homologes. Die meisten *trpB1* Gene sind Teil von *trp* Operons, *trpB2* Gene dagegen finden sich sowohl innerhalb (*trpB2i*) und außerhalb (*trpB2o* sowie das phylogenetisch unterscheidbare *trpB2a*) von Operons.

Es stellte sich die Frage ob TrpB2, wie TrpB1, in die Tryptophan Biosynthese involviert ist, oder ob es eine andere, noch unbekannte Funktion innehat. Um die Funktion von TrpB2 zu untersuchen, wurden in vorangegangenen Arbeiten die TrpA, TrpB1, TrpB2o, TrpB2i, und TrpB2a Proteine aus *T. maritima* und *S. solfataricus* heterolog exprimiert, gereinigt und bezüglich ihrer physikalischen und funktionellen Interaktionen charakterisiert (Hettwer & Sterner, 2002; Leopoldseder, 2005). Die Untersuchung der Enzyme aus *T. maritima* zeigte, dass nur das Operon-basierte tmTrpB1, aber nicht tmTrpB2o, mit tmTrpA interagiert, um den kanonischen $\alpha\beta\beta\alpha$ Tryptophan Synthase Komplex auszubilden, in dem sich beide Untereinheiten gegenseitig aktivieren (Hettwer & Sterner, 2002). Um zu überprüfen, ob die Komplexbildung mit TrpA eine spezielle Eigenschaft von TrpB1 Proteinen ist, wurden auch sTrpA, sTrpB2i und sTrpB2a aus *S. solfataricus* untersucht. Es zeigte sich, dass sTrpB2i während der Katalyse transient mit sTrpA assoziiert (Leopoldseder et al., 2006), um – wie im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt – einen Tryptophan Synthase Komplex mit einer $\alpha\beta\beta$ Quartärstruktur auszubilden (Kapitel 4.1). Analog zur fehlenden Interaktion von tmTrpB2o mit tmTrpA, konnte keine Komplexbildung oder funktionelle Interaktion zwischen dem außerhalb des Operons codierten sTrpB2a und sTrpA detektiert werden.

Wegen der fehlenden funktionellen Interaktion mit TrpA und dem gleichzeitigen Vorkommen von TrpB1 und TrpB2o in vielen Organismen ist es sehr wahrscheinlich, dass TrpB2o eine alternative physiologische Funktion hat, die nicht die der Tryptophan Biosynthese ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst einige frühere Hypothesen bezüglich der Funktion von TrpB2o überprüft und makromolekulare Interaktionsstudien durchgeführt. Anschließend wurden $\Delta trpB2o$ und $\Delta trpB1$ Stämme des hyperthermophilen Archaeons *Thermococcus kodakaraensis* hergestellt und bezüglich ihres Tryptophan-abhängigen Wachstumsverhaltens und ihrer Metabolomzusammensetzung analysiert. In diesem Kapitel werden die erhaltenen Ergebnisse beschrieben und die daraus gewonnenen Schlussfolgerungen diskutiert.

4.2.1 Überprüfung früherer Hypothesen bezüglich der Funktion von TrpB2o

Für *in vitro* Funktionsuntersuchungen an den außerhalb des *trp* Operons codierten TrpB2o und TrpB2a Proteine, die vermutlich die selbe Funktion haben, wurden die entsprechenden Enzyme aus *T. maritima* und *S. solfataricus* verwendet. Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung von tmTrpB2o und sTrpB2a, erfolgten wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben.

Es wurde vorgeschlagen, dass TrpB2o als Serin Desaminase wirken könnte (Xie et al., 2002). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die Desaminierung von Serin eine bekannte Nebenreaktion der TrpB1 Enzyme ist (Crawford & Ito, 1964). Zudem wurde spekuliert, dass die Expression von *trpB2o* in *Methanothermobacter thermoautotrophicus* durch die Verfügbarkeit von Serin reguliert sein könnte (Xie et al., 2002). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl tmTrpB2o als auch sTrpB2a nur eine sehr schwache Serin Desaminase Aktivität haben, die um mindestens eine Größenordnungen unterhalb der Serin Desaminase Nebenaktivität von tmTrpB1 liegt (Leopoldseder et al., 2006). Darüber hinaus wurde die Desaminase Aktivität von tmTrpB2o gegenüber den Substraten 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat (ACC) und L-Threonin getestet. Basierend auf der SCOP Datenbank sind die bekannten ACC- und Thr-Desaminasen Mitglied der gleichen strukturellen Superfamilie wie TrpB (Murzin et al., 1995), und es besteht ein auffallender Mangel an *trpB2o* Genen in Organismen, die diese beiden Enzyme enthalten. Es konnte jedoch mit Hilfe eines generellen, kolorimetrischen Desaminase Nachweises (3.5.16) keine Aktivität von tmTrpB2o mit den Substraten ACC oder L-Threonin detektiert werden. Der Test aller weiteren 19 natürlichen L-Aminosäuren ergab, außer der schwachen Desaminierungsreaktion gegenüber Serin, ebenfalls keine messbare Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Bereits früh wurde gezeigt, dass L-Cystein durch den Cofaktor PLP im aktiven Zentrum der *E. coli* Tryptophan Synthase aktiviert werden kann und dann als alternatives Substrat für die Bildung von Tryptophan an Stelle von Serin dient (Crawford & Ito, 1964). Die Messung der TrpB-Aktivität (3.5.15.2) von tmTrpB2o, tmTrpB1 und des Komplexes aus tmTrpA und tmTrpB1 zeigte, dass alle Enzyme Tryptophan aus Cystein und Indol bilden können, der Umsatz dabei allerdings nicht quantitativ ist, erkennbar an einer abflachenden Umsatzkurve, lange bevor ein Mangel an Substraten eintritt (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise hemmt der durch den in der Cystein-abhängigen TrpB-Kondensationsreaktion anstatt Wasser gebildete Schwefelwasserstoff die Enzyme. Tatsächlich inhibiert die Vorinkubation aller Enzyme mit Schwefelwasserstoff die serinabhängige TrpB-Kondensationsreaktion vollständig. Die Zugabe von Schwefelwasserstoff während der ablaufenden serinabhängigen TrpB-Reaktion dagegen führt zu keiner messbaren Inhibition (Daten nicht gezeigt). Es

scheint, als würde der Schwefelwasserstoff das aktive Zentrum der Enzyme binden und somit inhibieren, was durch die ablaufende TrpB-Reaktion mit Serin verhindert wird. Diese Ergebnisse lassen die cysteinabhängige Tryptophan Biosynthese als physiologische Funktion von TrpB2o äußerst unwahrscheinlich erscheinen.

Es wurde auch vorgeschlagen, dass TrpB2o Enzyme als Indol-Rettungsproteine wirken könnten, die die Diffusion des hydrophoben Metaboliten durch die Zellmembran bei den hohen physiologischen Wachstumstemperaturen von hyperthermophilen Organismen verhindern (Hettwer & Sterner, 2002). Diese Idee basierte auf der experimentellen Beobachtung, dass tmTrpB2o einen viel niedrigeren K_M (und folglich eine viel höhere Affinität) für Indol hat, als tmTrpB1 ($< 0,77 \mu\text{M}$ gegenüber $25 \mu\text{M}$). Um die Indolrettungshypothese zu testen, wurde die zelluläre Menge von tmTrpB1 und tmTrpB2o in *T. maritima* Zellen über Western Blots mit spezifischen Antikörpern bei verschiedenen Wachstumstemperaturen verglichen, wobei die optimale Wachstumstemperatur 80°C beträgt (Nelson et al., 1999) (Abbildung 56).

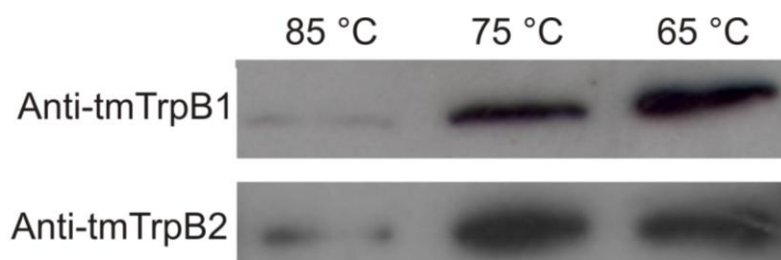


Abbildung 56: Quantifizierung von tmTrpB1 und tmTrpB2o in *T. maritima* bei verschiedenen Wachstumstemperaturen.

Die Zellen wurden in Minimalmedium ohne Tryptophan bei den drei gezeigten Wachstumstemperaturen angezogen (3.2.13). Nach dem Aufschluss wurden gleiche Mengen des Gesamtzellextrakts (entsprechend $2,8 \times 10^6$ Zellen) mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt und über Western Blots mit spezifischen Antikörpern die Menge and tmTrpB1 und tmTrpB2o bestimmt (3.5.6).

Sowohl die Menge von tmTrpB1 als auch die von tmTrpB2o ist in *T. maritima* Zellen, die bei 65°C und 75°C angezogen wurden, deutlich höher als bei 85°C . Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, das tmTrpB2o als Indol-Rettungsprotein wirkt, da Diffusion bei erhöhten Temperaturen beschleunigt ist und deshalb bei 85°C höhere Mengen des Proteins nötig wären, um Indol daran zu hindern, die Zelle zu verlassen.

Es wurde auch getestet, ob sich die *in vivo* Expression von tmTrpB1 und tmTrpB2o in Abhängigkeit des Substrates Indol und des Produktes Tryptophan unterscheidet. Die Zellen wurden in Minimalmedium ohne Tryptophan bei 80°C angezogen (3.2.13) und nach Zugabe von variablen Konzentrationen (0-50 mM) an Tryptophan bzw. Indol nach verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 120 min) Proben genommen und über Western Blots analysiert. Es zeigte sich in beiden Fällen keine klare Abhängigkeit der Proteinmenge von der Anwesenheit der

Metabolite, weshalb keine Aussagen über die Regulation getroffen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Suche nach makromolekularen Interaktionspartnern von TrpB2o

Als weiterer Ansatz zur Funktionsaufklärung von TrpB2o wurde nach zellulären Interaktionspartnern dieses Enzyms in den Organismen *T. maritima* und *S. solfataricus* gesucht. Dazu wurde das in Kapitel 4.1.4.4 etablierte Verfahren verwendet, bei dem lösliche Zellextrakte über analytische Gelfiltration aufgetrennt und die fraktionierten Proben anschließend mit Hilfe von spezifischen anti-tmTrpB2o bzw. anti-sTrpB2a Antikörpern analysiert wurden. Durch Vergleich der Elutionszeit von zellulärem TrpB Protein mit der Elutionszeit des jeweils zugesetzten, rekombinanten Proteins können Aussagen über den *in vivo* Assoziationszustand getroffen werden. Funktionsweise und Validität des Verfahrens wurden in Abbildung 53 anhand der Interaktion zwischen tmTrpA und tmTrpB1 gezeigt.

Um eine Aussage über den *in vivo* Assoziationszustand und damit über mögliche Interaktionspartner von tmTrpB2o zu erhalten, wurde das Experiment mit einem löslichen Zellextrakt aus *T. maritima* und rekombinant hergestelltem tmTrpB2o als internem Standard durchgeführt. Dabei wurde sowohl der unbehandelte, lösliche Zellextrakt, als auch ein über Anionenaustauscherchromatographie mit tmTrpB2o angereicherter Extrakt verwendet. In Abbildung 57 ist exemplarisch der Verlauf des Gelfiltrationsexperiments mit dem angereicherten Extrakt gezeigt. Der unbehandelte Extrakt lieferte identische Ergebnisse.

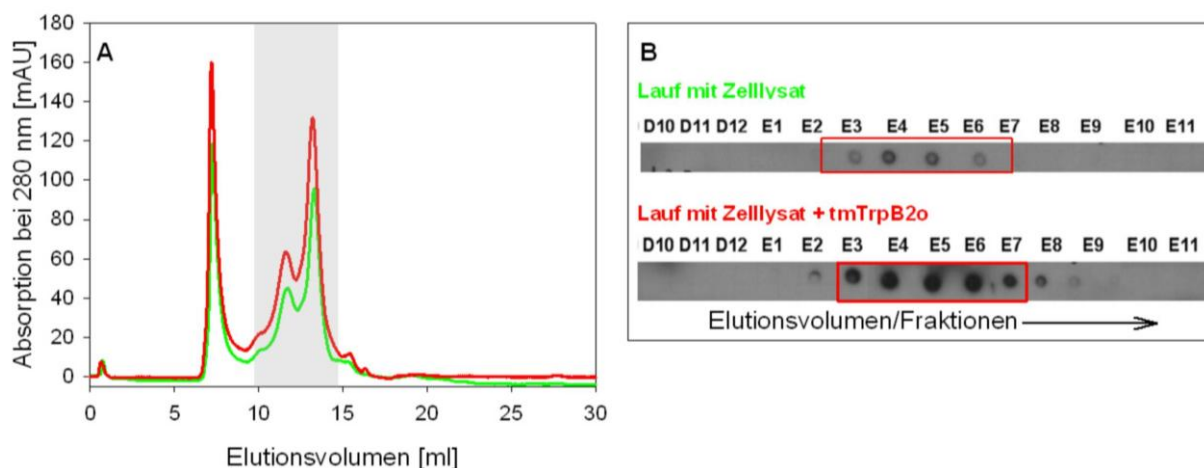


Abbildung 57: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der makromolekularen Assoziation von tmTrpB2o in löslichen Zellextrakten aus *T. maritima*.

A Elutionsprofile von Gelfiltrationsläufen von 500 µl Extrakt mit 900 µg Protein aus *T. maritima* (grün) bzw. 500 µl einer Mischung aus 900 µg Proteinextrakt und 1,5 µM (35 µg) rekombinant hergestelltem tmTrpB2o (rot). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 50 mM KP Puffer, pH 7,5, 300 mM KCl als Laufmittel auf einer Superose 12 10/300 GL Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Es wurden jeweils Fraktionen von 0,25 ml gesammelt. Die Extrakte wurden für dieses Experiment über Anionenaustauscherchromatographie vorgereinigt (**3.4.2.3**) **B** Analyse der gesammelten Fraktionen, die in A grau hinterlegt sind, über Immunodetektion mit anti-TrpB2o Antikörper. Es wurden je 5 µl der 1:3 (Lauf ohne internen Standard) bzw. 1:35 (Lauf mit internem Standard) verdünnten Fraktionen auf den Dot Blot aufgebracht und wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben analysiert. Die roten Markierungen heben die Hauptfraktionen von tmTrpB2o hervor.

Die Überlagerung der Elutionsprofile der beiden Gelfiltrationsläufe (Abbildung 57 A) belegt die Identität der chromatographischen Auftrennung mit und ohne rekombinantem tmTrpB1. Die Immunodetektion von tmTrpB2o in den entsprechenden Fraktionen beider Läufe zeigt, dass der zugesetzte interne tmTrpB2o Standard gleichzeitig mit dem zellulären tmTrpB2o eluiert (Abbildung 57 B). Der Überschuss an rekombinanten tmTrpB2o wurde so groß gewählt (35 µg bei 900 µg Gesamtproteinmenge im Zellextrakt), dass ausgeschlossen werden kann, dass das zugesetzte Protein von einem in großem Überschuss vorhandenen putativen Interaktionspartner vollständig komplexiert wird und dadurch gleichzeitig mit dem entsprechenden Komplex des zellulären tmTrpB2o eluieren würde. Die Ergebnisse liefern somit keinen Hinweis darauf, dass tmTrpB2o *in vivo* einen stabilen Komplex mit einem weiteren Makromolekül eingeht.

In analoger Weise wurde nach makromolekularer Assoziation von sTrpB2a in einem löslichen Rohextrakt aus *S. solfataricus* gesucht (Abbildung 58).

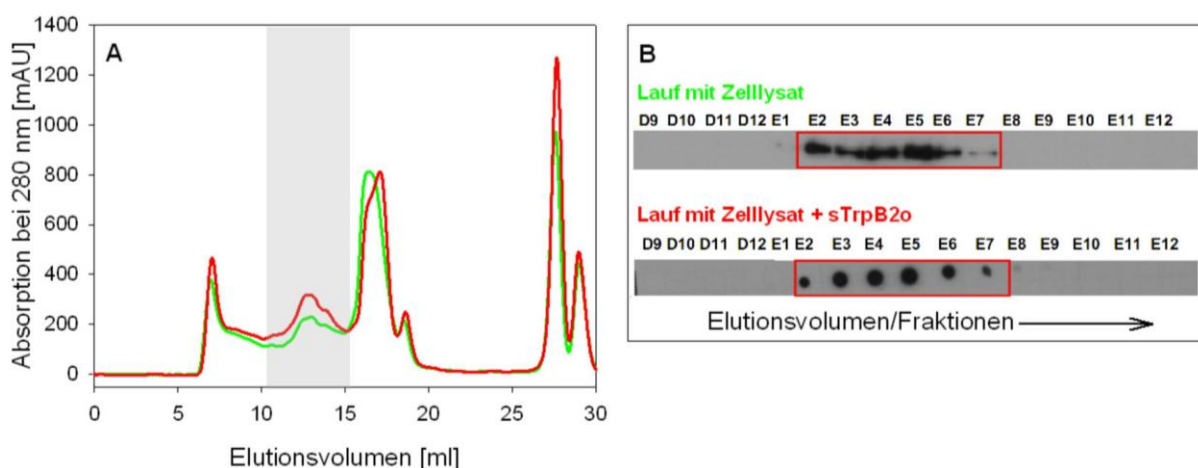


Abbildung 58: Analytische Gelfiltration zur Untersuchung der makromolekularen Assoziation von sTrpB2a in löslichen Zellextrakten aus *S. solfataricus*.

A Elutionsprofile von Gelfiltrationsläufen von 500 µl Extrakt mit 500 µg Protein aus *S. solfataricus* (grün) bzw. 500 µl einer Mischung aus 500 µg Proteinextrakt und 0,5 µM (12 µg) rekombinant hergestelltem sTrpB2a (rot). Die Elution wurde bei 25 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 10 mM KP Puffer, pH 7,0, 100 mM KCl, 200 mM L-Serin, 60 mM *rac* GP, 0,05% Natriumazid als Laufmittel auf einer Superose 12 10/300 GL Säule durchgeführt und über Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Es wurden jeweils Fraktionen von 0,25 ml gesammelt. **B** Analyse der gesammelten Fraktionen, die in A grau hinterlegt sind, über Immunodetektion mit anti-TrpB2o Antikörper. Es wurden je 5 µl der unverdünnten (Lauf ohne internen Standard) bzw. 1:10 (Lauf mit internem Standard) verdünnten Fraktionen auf den Dot Blot aufgebracht und wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben analysiert. Da die Menge an zellulärem sTrpB2a unter der Nachweisgrenze des Dot Blots lag, wurden die Fraktionen über eine Acetonpräzipitation (3.4.2.6) um den Faktor 12,5 angereichert und über Western Blot analysiert (3.5.6). Die roten Markierungen heben die Hauptfraktionen von tmTrpB2o hervor.

Auch hier sind die beiden Elutionsprofile sehr ähnlich (Abbildung 58 A) und das als interner Standard zugesetzte sTrpB2a eluiert gleichzeitig mit dem zellulären sTrpB2a (Abbildung 58 B), was gegen die Komplexbildung mit einem anderen Makromolekül spricht.

Um die Ergebnisse zu validieren, wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt, bei dem lösliche Zellextrakte aus *T. maritima* über native Gelelektrophorese (3.5.5) analysiert wurden.

Dazu wurden zuerst die Laufbedingungen anhand der gereinigten Proteine tmTrpA, tmTrpB1 und tmTrpB2o optimiert, wobei sich ein Gel mit einem pH-Wert von 6,9 als optimal herausstellte (Abbildung 59).

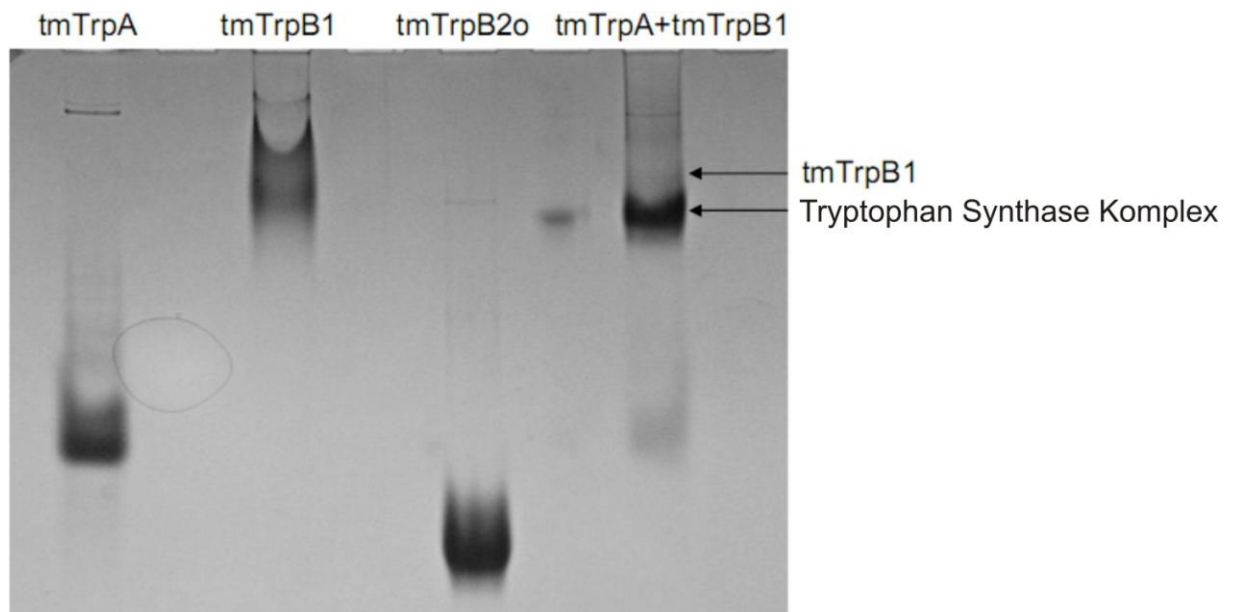


Abbildung 59: Native Gelelektrophorese zum Nachweis des Komplexes zwischen tmTrpA und tmTrpB1 *in vitro*.

Gezeigt ist die native PAGE (3.5.5) von 15 µg tmTrpA, 15 µg tmTrpB1, 15 µg tmTrpB2o und einer Mischung aus je 7,5 µg tmTrpA und tmTrpB1 nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250 (3.5.3). Die Mobilitätsveränderung von tmTrpB1 durch Mischung mit tmTrpA spiegelt die Komplexbildung der beiden Proteine wider.

Das Experiment wurde in analoger Weise mit einem löslichen Zellextrakt aus *T. maritima* wiederholt, wobei als interner Standard rekombinant exprimiertes tmTrpB1 bzw. tmTrpB2o zugesetzt wurde. Durch Vergleich des Laufverhaltens des Standards mit den entsprechenden zellulären Proteinen konnten Aussagen über eine mögliche makromolekulare Assoziation getroffen werden (Abbildung 60).

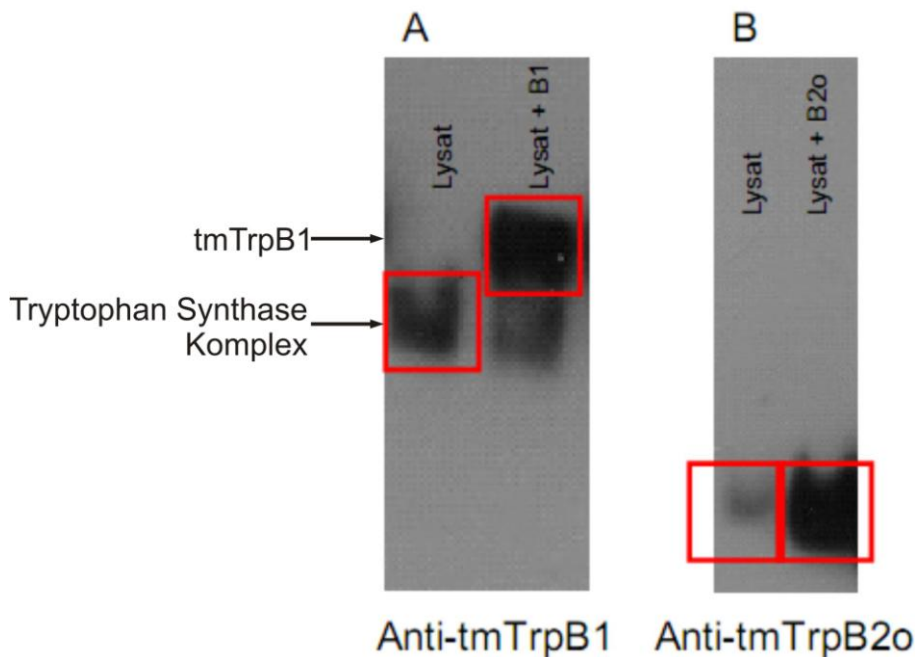


Abbildung 60: Native PAGE zur Untersuchung makromolekularer Assoziation von tmTrpB1 und tmTrpB2o in löslichen Zellextrakten aus *T. maritima*.

Gezeigt ist die native PAGE (3.5.5) von **A** 3,75 µg *T. maritima* Zellextrakt bzw. einer Mischung aus 7,5 µg *T. maritima* Zellextrakt und 6 ng tmTrpB1 und **B** 3,75 µg *T. maritima* Zellextrakt bzw. einer Mischung aus 7,5 µg *T. maritima* Zellextrakt und 10 ng tmTrpB2o. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Western Blots mit spezifischen anti-tmTrpB1 bzw. anti-tmTrpB2o Antikörpern (3.5.6).

Das unterschiedliche Laufverhalten von zellulärem tmTrpB1 und dem als internen Standard zugesetzten, rekombinant gewonnenem tmTrpB1 (Abbildung 60 A), spiegelt den im zellulären Milieu vorliegenden Tryptophan Synthase Komplex wider, der auch *in vitro* etwas schneller als isoliertes tmTrpB1 wandert (vgl. Abbildung 59). Dagegen zeigen zelluläres tmTrpB2o und das als interner Standard zugesetzte tmTrpB2o ein identisches Laufverhalten, was gegen eine stabile Assoziation mit einem anderen Makromolekül spricht. Im Gegensatz zur analytischen Gelfiltration, bei der salzhaltige Elutionsmittel verwendet werden müssen, um ionische Wechselwirkungen der Probe mit dem Säulenmaterial zu unterdrücken, wird bei der nativen PAGE kein Salz im Laufpuffer zugesetzt. Es kann damit ausgeschlossen werden, dass ein putativer, durch ionische Wechselwirkungen stabilisierter tmTrpB2o Proteinkomplex durch Salz dissoziiert wird.

Somit lässt sich feststellen, dass weder analytische Gelfiltration noch native PAGE Hinweise auf die Interaktion von tmTrpB2o oder sTrpB2a mit Makromolekülen *in vivo* und damit auf ihre mögliche physiologische Funktion liefern.

4.2.3 Erstellung von Deletionsstämmen in *T. kodakaraensis*

Die Deletion von Genen ist eine aussagekräftige und direkte Methode, um die Funktion von Enzymen *in vivo* zu untersuchen. *T. kodakaraensis* ist einer der wenigen hyperthermophilen

Mikroorganismen, für den ein System zur gezielten Deletion von Genen entwickelt wurde. Es beruht das auf dem Prinzip der homologen Rekombination (Sato et al., 2005).

Das System, mit dem Deletionsmutanten erstellt werden können, nutzt den Uracil-auxotrophen Stamm KU216, bei dem das *pyrF* Gen vollständig deletiert wurde (Sato et al., 2005). Dieses für die Uracil-Biosynthese essentielle Gen codiert für die Orotidin-5'-phosphat Decarboxylase, weshalb KU216 nur in Anwesenheit von Uracil im Medium wachsen kann. Um Deletionsmutanten zu erstellen, wird ein Konstrukt in einem beliebigen Plasmid hergestellt, welches *pyrF*, flankiert von stromaufwärts und stromabwärts gelegenen, homologen Bereichen des zu deletierenden Gens (jeweils ca. 1 kb), enthält. Mit diesem Plasmid wird der Stamm KU216 transformiert und auf Klone, die nach einem doppelten *crossover* anstelle des Zielgens das *pyrF* Gen enthalten, selektiert. Die Selektion erfolgt auf Minimalmedium ½ SME -AA ohne Uracil, in dem die 20 natürlichen Aminosäuren als einzige Kohlenstoffquelle enthalten sind (2.13). Durch das Weglassen einzelner Aminosäuren kann getestet werden, ob das Produkt eines deletierten Gens für die Biosynthese dieser Aminosäure essentiell ist.

Um die physiologische Funktion von TrpB2o zu untersuchen, wurden $\Delta trpB2o$ und als Referenz $\Delta trpB1$ Stämme von *T. kodakaraensis* hergestellt und bezüglich ihres Tryptophan-abhängigen Wachstumsverhaltens und ihrer Metabolomzusammensetzung analysiert. Um die korrekte Expression der restlichen Gene des *trp* Operons von $\Delta trpB1$ zu verifizieren, wurde die Doppelmutante $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$ hergestellt. Bei dieser wurde *trpB1* an anderer Stelle außerhalb des *trp* Operons im Genom des $\Delta trpB1$ Stammes eingefügt, wodurch bei korrekter Herstellung der restlichen Enzyme der Tryptophan Biosynthese Tryptophan-Prototrophie zu erwarten war.

Die Herstellung der Deletionsmutanten erfolgte in Kooperation mit Ingrid Waege (Waege, 2009) und Winfried Hausner (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg). Die DNA Sequenzen der erstellten Konstrukte finden sich in Anhang 6.5.

4.2.4.1 Erzeugung von *T.kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB2o$

Für die Herstellung von *T.kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB2o$ wurde ein Teil des *trpB2o* Gens (*gene identifier* tk1442) aus dem Genom entfernt, und durch den Selektionsmarker *pyrF* ersetzt. Dabei wurde die Länge des zu deletierenden Bereichs von *trpB2o* möglichst ähnlich zu *pyrF* gewählt, um Schleifenbildung während der homologen Rekombination zu vermeiden. Da *trpB2o* deutlich größer als *pyrF* ist (1,3 kb und 0,6 kb), blieb ein Teil von *trpB2o* (0,7 kb) im Genom erhalten. Deletiert wurde der N-terminale Bereich des Genprodukts bis einschließlich Aminosäure 266, wobei das den Cofaktor PLP bindende Lysin 110 entfernt wurde, was zum vollständigen Verlust der Aktivität führt. Um die homologe Rekombination über doppelten *crossover* zu ermöglichen, wurden an das *pyrF* Gen an beiden Enden die unmittelbar stromaufwärts bzw. stromabwärts gelegenen Sequenzbereiche (jeweils 1 kb) des

zu entfernenden *trpB2o* Anteils fusioniert. Sie entsprechen dem 3'-terminalen Bereich von *tk1441* (Genprodukt unbekannter Funktion) bzw. dem 3'-terminalen Bereich von *tktrpB2o* plus dem 5'-terminalen Bereich von *tk1443* (Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase) (Abbildung 61).

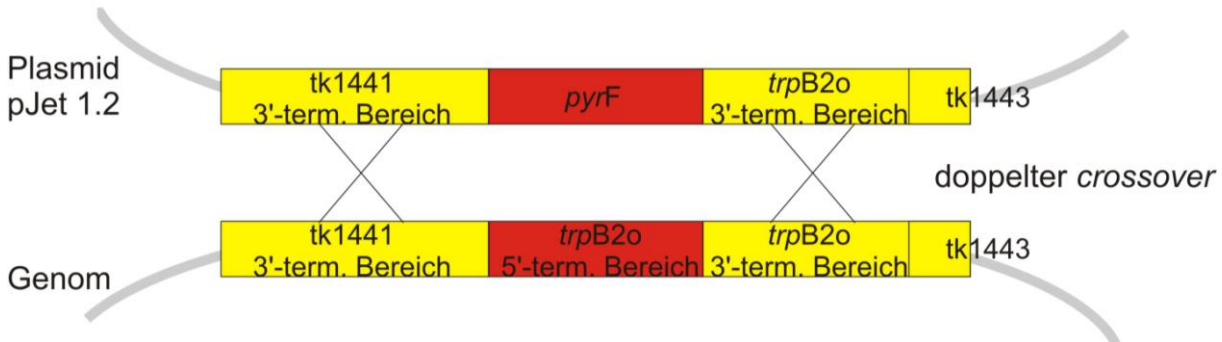


Abbildung 61: Strategie zur Herstellung von *T. kodakaraensis* $\Delta trpB2o$ über homologe Rekombination.

Durch den doppelten *crossover* über die flankierenden Regionen wird der 5'-terminale Bereich von *trpB2o* durch *pyrF* (inklusive seines konstitutiven Promoters) ersetzt. Dieses Rekombinationsereignis führt zu einer Uracil Prototrophie des auxotrophen KU 216 Stammes, auf die selektiert werden kann.

Das Zusammenfügen der Komponenten erfolgte über OE-PCR (3.3.9.2) und das Produkt anschließend über *blunt end* Klonierung in den Vektor pJet 1.2 (2.2.3) ligiert (Abbildung 62).

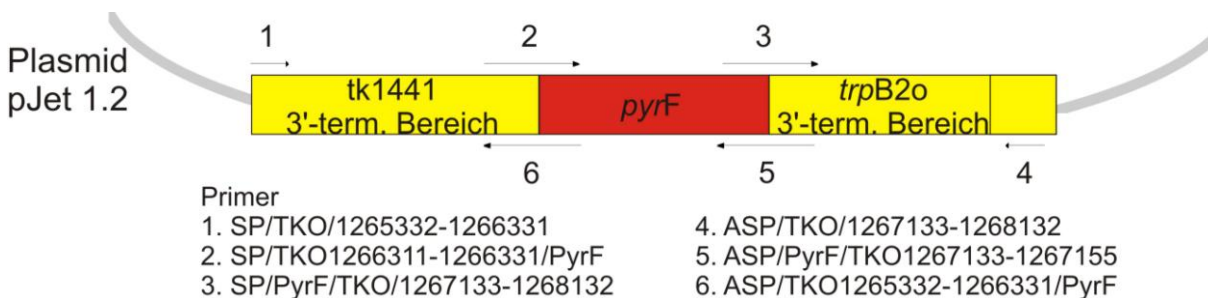


Abbildung 62: Herstellung des Konstrukts pJet 1.2. $\Delta trpB2o$.

Durch PCR auf gDNA von *T. kodakaraensis* wurden über die Primerpaare 1/6 (Fragment A), 2/5 (Fragment B) und 3/4 (Fragment C) überlappende Fragmente amplifiziert. Diese wurden über OE-PCR zusammengefügt (3.3.9.2). Zuerst wurden die Fragmente A und B über die Außenprimer 1 und 5 zum Fragment AB zusammengefügt. Dieses wurde anschließend über die Außenprimer 1 und 4 mit Fragment C fusioniert, um das fertige Konstrukt zu bilden welches in den Vektor pJet 1.2. ligiert (3.3.9.2) wurde. Die Primersequenzen finden sich in Kapitel 2.3.4. und die durch DNA-Sequenzierung überprüfte Nukleotidabfolge des klonierten Konstrukts in Anhang 6.5.

Die Transformation von *T. kodakaraensis* Zellen mit dem Plasmid, die Selektion positiver Klone über Uracil-Prototrophie und die Verifizierung der Integrationsstelle über PCR Analyse und Southern Blot wurden von Ingrid Waage durchgeführt (Waage, 2009).

4.2.4.2 Erzeugung von *T.kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB1$

Der Deletionsstamm *T.kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB1$ wurde in analoger Weise wie in Kapitel 4.2.4.1 für $\Delta trpB2o$ beschrieben durchgeführt. Dabei wurden ca. 800 bp am 5'-terminalen Ende des 1,2 kb großen *trpB1* Gens durch *pyrF* ersetzt, d. h. es blieben 0,4 kb von *trpB1*

erhalten. Wiederum wurden an das *pyrF* Gen flankierende Bereiche von jeweils 1 kb angefügt, stromaufwärts der 3'-terminale Bereich von *trpF* und stromabwärts der 3'-terminale Bereich von *trpB1* plus eines 5'-terminalen Anteils von *trpA* (Abbildung 63).

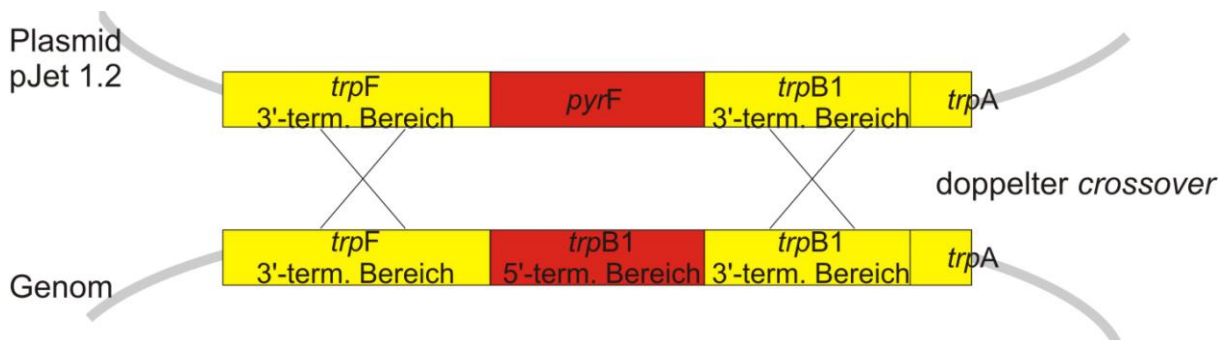


Abbildung 63 Strategie zur Herstellung von *T. kodakaraensis* $\Delta trpB1$ über homologe Rekombination.

Durch den doppelten *crossover* über die flankierenden Regionen wird der 5'-terminale Bereich von *trpB1* durch *pyrF* (inklusive seines konstitutiv aktiven Promoters) ersetzt. Dieses Rekombinationsereignis führt zu einer Uracil Prototrophie des auxotrophen KU 216 Stammes, auf die selektiert werden kann.

Das Zusammenfügen der Komponenten erfolgte über OE-PCR (3.3.9.2) und das Produkt wurde anschließend über *blunt end* Klonierung in den Vektor pJet 1.2 (2.2.3) ligiert (Abbildung 64).

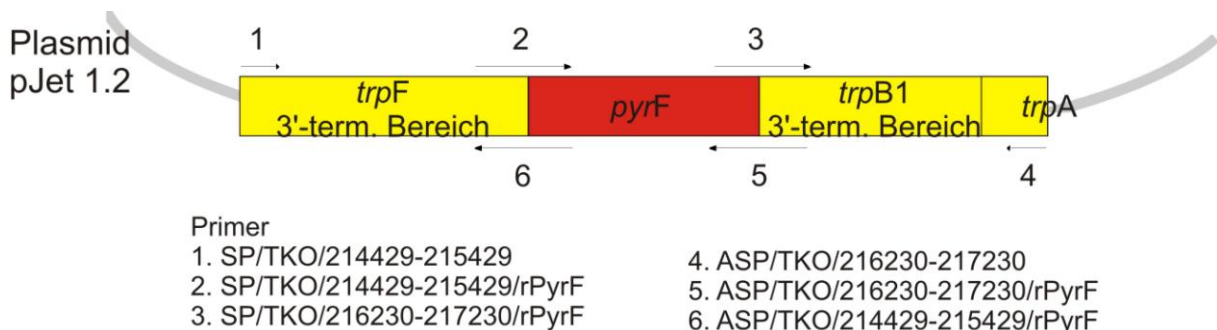


Abbildung 64: Herstellung des Konstrukts pJet 1.2. $\Delta trpB1$.

Durch PCR auf gDNA von *T. kodakaraensis* wurden über die Primerpaare 1/6 (Fragment A), 2/5 (Fragment B) und 3/4 (Fragment C) überlappende Fragmente amplifiziert. Diese wurden über OE-PCR zusammengefügt (3.3.9.2). Zuerst wurden die Fragmente A und B über die Außenprimer 1 und 5 zum Fragment AB zusammengefügt. Dieses wurde anschließend über die Außenprimer 1 und 4 mit Fragment C fusioniert, um das fertige Konstrukt zu bilden welches in den Vektor pJet 1.2. ligiert (3.3.9.2) wurde. Die Primersequenzen finden sich in Kapitel 2.3.4. und die durch DNA-Sequenzierung überprüfte Nukleotidabfolge des klonierten Konstrukts in Anhang 6.5.

Die Transformation von *T. kodakaraensis* Zellen mit dem Plasmid, die Selektion positiver Klone über Uracil-Prototrophie und die Verifizierung der Integrationsstelle über PCR Analyse wurden von Ingrid Waege durchgeführt (Waege, 2009).

4.2.4.3 Erzeugung von *T.kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$

Im Deletionsstamm *T.kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB1$ steht durch Einfügen des konstitutiven *pyrF* Promoters auch das stromabwärts liegende *trpA* Gen unter Kontrolle dieses Promoters (Abbildung 65).

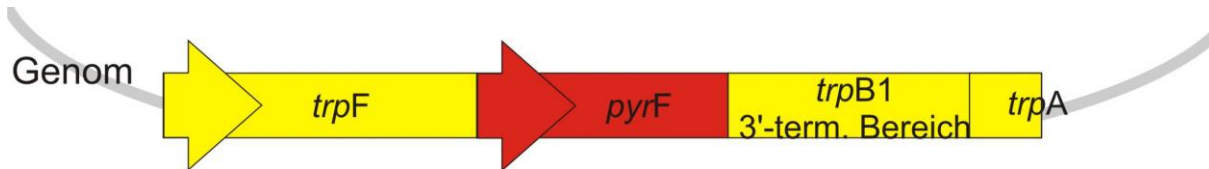


Abbildung 65: Organisation des *trp* Operons in *T.kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB1$.

Der gelbe Pfeil symbolisiert den zellulären Promoter des *trp* Operons, der rote Pfeil den über den Selektionsmarker eingefügten, konstitutiven *pyrF* Promoter. *TrpA* steht unter Kontrolle des *pyrF* Promoters.

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Tryptophan-Auxotrophie von KU216 $\Delta trpB1$ (Abbildung 69) lediglich auf nicht ausreichenden Expression von *trpA* zurückzuführen ist.

Deshalb wurde ein Komplementationsstamm erstellt, der auf dem KU216 $\Delta trpB1$ Stamm basiert und zusätzlich einen Austausch des für die L-Histidinol Dehydrogenase codierenden Gens *hisD* durch *trpB1* aufweist (Abbildung 66). Dadurch erfolgt die zelluläre Expression von *trpB1* unter Kontrolle des *pyrF* Promoters.

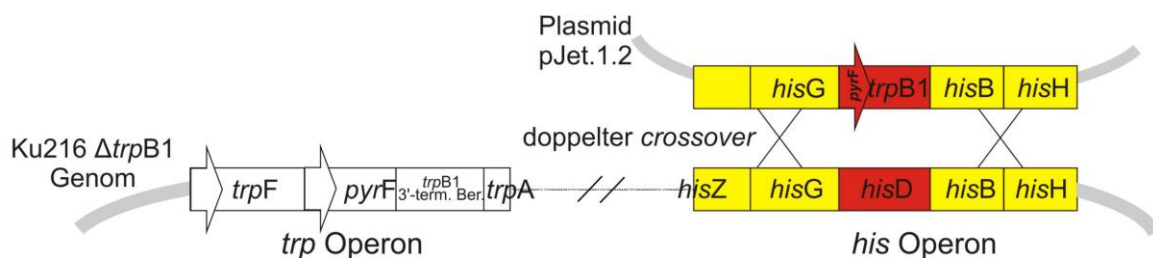


Abbildung 66: Strategie zur Herstellung des Komplementationsstamms *T. kodakaraensis* $\Delta hisD::trpB1$ über homologe Rekombination.

Durch den doppelten *crossover* über die flankierenden Regionen wird *hisD* durch *trpB1* ersetzt. Dies führt zu Histidin-Auxotrophie und im Falle der korrekten Expression des nicht Operon-ständigen *trpA* zu Tryptophan-Prototrophie.

Falls der Phänotyp des KU216 $\Delta trpB1$ Stamms von Tryptophan-Auxotrophie zu Prototrophie dadurch revertiert wird, ist dies ein Beleg dafür, dass das *trpA* Gen unter Kontrolle der *pyrF* Promoters in diesem Stamm in ausreichendem Maß transkribiert wird.

Das Zusammenfügen der Komponenten erfolgte über OE-PCR (3.3.9.2) und das Produkt wurde anschließend über *blunt end* Klonierung in den Vektor pJet 1.2 (2.2.3) ligiert (Abbildung 67).

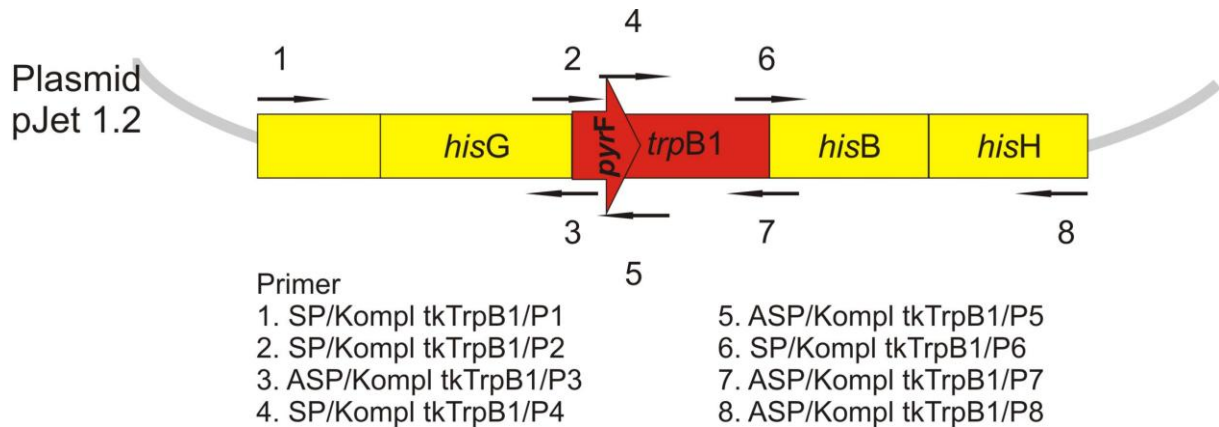


Abbildung 67: Herstellung des Konstrukts pJet 1.2. Δ hisD::trpB1.

Durch PCR auf gDNA von *T. kodakaraensis* wurden über die Primerpaare 1/3 (Fragment A), 2/5 (Fragment B), 4/7 (Fragment C) und 6/8 (Fragment D) überlappende Fragmente amplifiziert. Diese wurden über OE-PCR zusammengefügt (3.3.9.2). Zuerst wurden die Fragmente A und B (Außenprimer 1/5) bzw. C und D (Außenprimer 4/8) fusioniert. Fragment AB und CD wurden schließlich über die Außenprimer 1/8 verknüpft, um das fertige Konstrukt zu bilden welches in den Vektor pJet 1.2. ligiert (3.3.9.2) wurde. Die Primersequenzen finden sich in Kapitel 2.3.4. und die durch DNA-Sequenzierung überprüfte Nukleotidabfolge des klonierten Konstrukts in Anhang 6.5.

Die Transformation von *T. kodakaraensis* mit pJet 1.2 Δ hisD::trpB1 wurde mittels eines Hitzeschrittes nach Waage (2009) wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben ausgeführt. Da der Ausgangsstamm KU216 Δ trpB1 vollständig Tryptophan auxotroph und Uracil prototroph ist (4.2.4), wurde die Selektion mit $\frac{1}{2}$ SME-AA (ohne Uracil, ohne Tryptophan) Medium durchgeführt. Der Austausch von *hisD* durch *trpB1* sollte den Zellen das Wachstum ohne Tryptophan ermöglichen, was der Fall war.

Um sicherzustellen, dass die Integration von *trpB1* bei positiven Transformanten an der richtigen Stelle im Genom stattgefunden hat, wurde genomische DNA der Stämme KU216 und KU216 Δ trpB1 Δ hisD::trpB1 einer PCR-Analyse im Bereich der Integrationsstelle unterzogen (Abbildung 68).

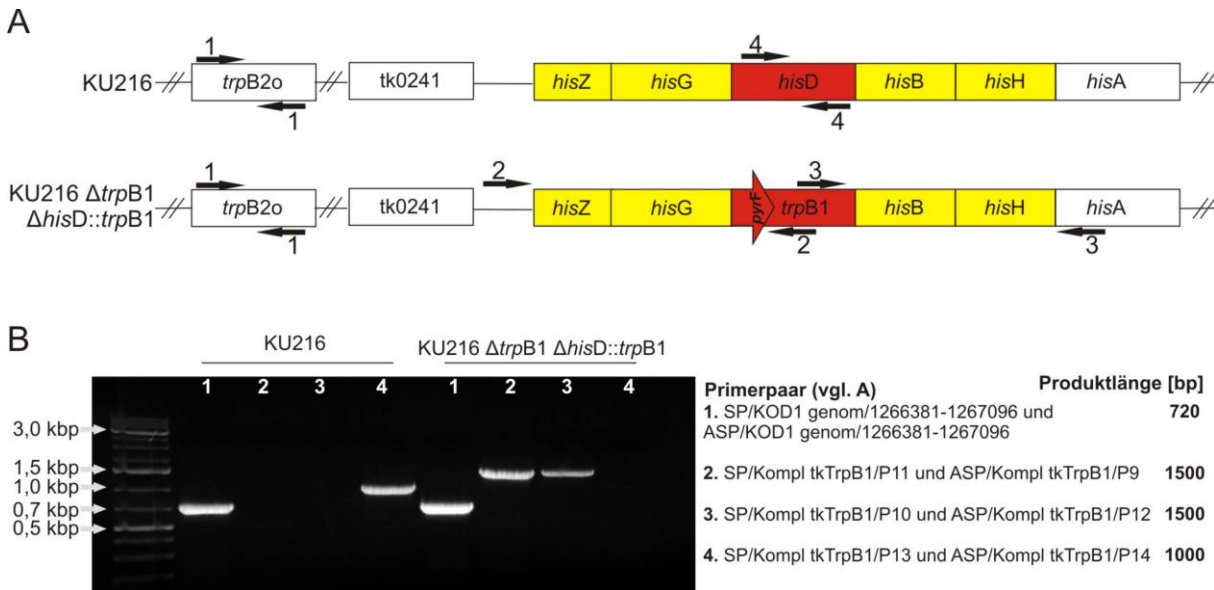


Abbildung 68: Verifizierung des Stammes $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$ über PCR Analyse.

A Lage der Primerpaare zur Überprüfung der genomischen Situation im Ausgangsstamm KU216 (oben) und KU216 $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$ (unten). **B** PCR Analyse genomischer DNA von *T. kodakaraensis* KU216 (links) und KU216 $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$ (rechts). Die erwartete Produktlängen und die Namen der Primerpaare sind neben dem Gel rechts gezeigt, ihre Sequenzen finden sich in Kapitel 2.3.4.

Dazu wurden Primerpaare verwendet, die die einzelnen Sequenzbereiche, die Teil der genomischen Veränderung sind, abdecken (Abbildung 68 A). Durch Primerpaar 1, welches abseits der Integrationsstelle bindet, lässt sich die Integrität der isolierten genomischen DNAs nachweisen. Die Primerpaare 2 und 3 führen zur Amplifizierung der flankierenden Bereiche der deletierten *hisD* Region, jedoch nur, falls sich an entsprechender Position nun *trpB1* befindet. Mit Primerpaar 4 hingegen soll die Abwesenheit des zu von *hisD* in der Doppelmutante verifiziert werden. Abbildung 68 B zeigt das Ergebnis der PCR-Analyse. Die Kontroll-PCR mit Primerpaar 1 lieferte für beide Stämme das erwartete Amplifikationsprodukt. Ebenfalls wie erwartet lieferte das gegen *hisD* gerichtete Primerpaar 4 im Ausgangsstamm KU216 ein 1000 bp großes Produkt, welches in den untersuchten Transformanten fehlt. Die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Integrationsstellen, also die Bereiche, an denen die homologe Rekombination erfolgt ist, konnten wie geplant nur in KU216 $\Delta hisD::trpB1$ amplifiziert werden (Primerpaare 2 und 3, Produktlänge jeweils 1500 bp). Bei diesen Primerpaaren bindet jeweils ein Primer innerhalb des eingefügten *trpB1* und der andere an einer Position, die vom doppelten *crossover* unverändert bleibt. Somit konnte die geplante genomische Organisation in KU216 $\Delta hisD::trpB1$ bestätigt werden.

4.2.4 Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten im Vergleich mit wildtypischem *T. kodakaraensis*

Die TrpB2o Enzyme katalysieren *in vitro*, genau wie die homologen TrpB1 Enzyme, die Umsetzung von Indol und Serin zu Tryptophan, allerdings mit deutlich niedrigerer katalytischer Effizienz. Darüber hinaus existiert keine messbare physikalische oder funktionale Interaktion mit den jeweiligen TrpA Enzymen (Hettwer & Sterner, 2002; Leopoldseder et al., 2006). Im Zusammenhang mit der Suche nach der physiologischen Funktion von TrpB2o stellt sich die Frage, ob die schwache Tryptophan Synthase Aktivität *in vitro* eventuell *in vivo* relevant ist. Um dies zu klären, wurde das Wachstumsverhalten von *T. kodakaraensis* KU216 mit dem der erstellten Deletionsstämme in $\frac{1}{2}$ SME -AA Minimalmedium bei 85 °C in An- und Abwesenheit von Tryptophan verglichen. Die Experimente wurde wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben von Ingrid Waege (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg) durchgeführt (Waege, 2009). Die Ergebnisse sind in Abbildung 69 dargestellt.

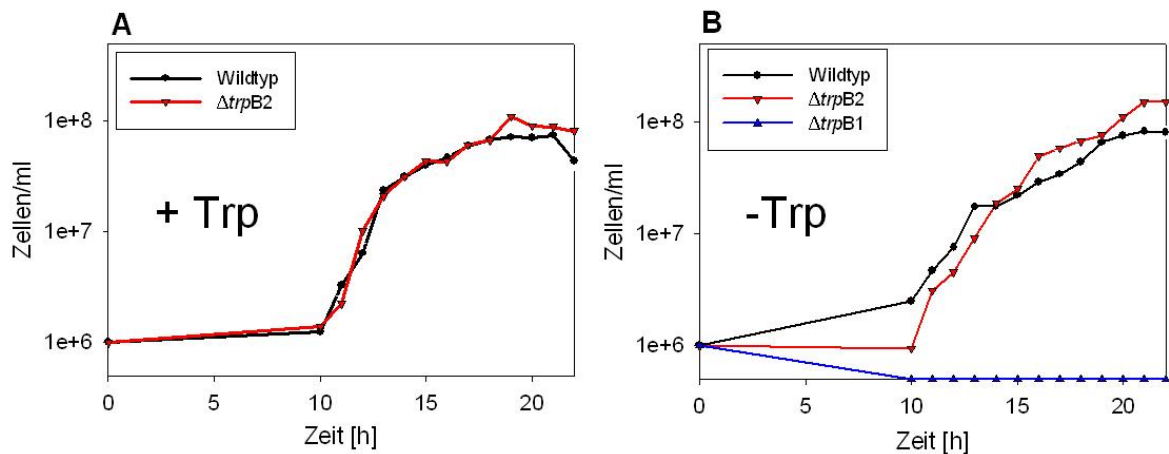


Abbildung 69: Wachstumsverhalten von *T. kodakaraensis* KU 216 Wildtyp, $\Delta trpB2$ und $\Delta trpB1$ bei 85 °C.

A Wachstumskurven in $\frac{1}{2}$ SME-AA Minimalmedium mit 75 μ g/ml L-Tryptophan (KU216 Wildtyp + 5 μ g/ml Uracil). **B** Wachstumskurven in $\frac{1}{2}$ SME-AA Minimalmedium ohne L-Tryptophan (KU216 Wildtyp + 5 μ g/ml Uracil). Die gemessenen Zelldichten (3.2.11) wurden logarithmisch gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte für zwei unabhängig gezogene und gemessene Kulturen.

T. kodakaraensis KU216 Wildtyp und $\Delta trpB2$ zeigten in Anwesenheit von Tryptophan keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten (Abbildung 69 A). Der $\Delta trpB1$ Stamm wuchs in Anwesenheit von Tryptophan ebenfalls ähnlich zum Wildtyp, wobei hier keine Wachstumskurve aufgezeichnet wurde. In Abwesenheit von Tryptophan zeigte sich ebenfalls kein nennenswerter Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp und $\Delta trpB2$, wohingegen KU216 $\Delta trpB1$ abstarb (Abbildung 69 B). Um auszuschließen, dass die Letalität von $\Delta trpB1$ auf die unzureichende Transkription des unter der Kontrolle des *pyrF* Promoters stehenden

trpA Gens zurückzuführen ist (Abbildung 65), wurde der Komplementationsstamm KU216 $\Delta trpB1 \Delta hisD::trpB1$ erstellt. Dieser zeigt in Abwesenheit von Tryptophan wildtypähnliches Wachstumsverhalten (es wurde keine vollständige Wachstumskurve aufgezeichnet). Das zeigt, dass der Tryptophan-abhängige Phänotyp von $\Delta trpB1$ ausschließlich durch das Fehlen des TrpB1 Enzyms verursacht wird und TrpA in ausreichender Menge vorhanden ist.

Die Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich wie folgt zusammenfassen. Durch die Deletion von *trpB2* ist kein Phänotyp entstanden, was ein Beleg dafür ist, dass die physiologische Funktion von TrpB2o unter den getesteten Bedingungen nicht für das Überleben der Zelle essentiell ist. Das ähnliche Wachstumsverhalten mit und ohne Tryptophan zeigt, dass TrpB2o nicht essentiell für die Tryptophan Biosynthese ist. Diese Schlussfolgerung wird durch die Letalität von $\Delta trpB1$ unterstützt. Sie belegt, dass die *in vitro* gemessene, schwache Tryptophan Synthase Aktivität von TrpB2o *in vivo* das Fehlen von TrpB1 nicht komplementieren kann. Offensichtlich steht TrpB2o in keinem direkten Zusammenhang mit der Tryptophanbiosynthese und hat eine andere, noch unbekannte physiologische Funktion.

4.2.5 Katalytische Parameter der TrpB-Reaktion von TrpB2o

Die *in vivo* Studien zum Tryptophan-abhängigen Wachstum der $\Delta trpB2$ und $\Delta trpB1$ Stämme zeigte eindeutig, dass TrpB2o keine physiologisch relevante Tryptophan Synthase Aktivität aufweist. Betrachtet man allerdings die katalytischen Parameter der TrpB2o Enzyme, so fällt auf, dass die Michaelis-Menten Konstante für Indol (K_M^{Indol}) mit 6 μM für sTrpB2a (Leopoldseder et al., 2006) und <0,77 μM für tmTrpB2o (Hettwer & Sterner, 2002) auffallend niedrig sind. Im Gegensatz dazu legen die Michaelis-Menten Konstanten für Serin (K_M^{Ser}) in der Größenordnung von 100 mM und damit extrem hoch (Tabelle 8 im Anhang). Nimmt man für *T. maritima*, *T. kodakaraensis* und *S. solfataricus* ähnliche cytosolische Konzentrationen an Serin an, wie in *E. coli* (68-150 μM ; Bennett et al., 2009), so kann davon ausgegangen werden, dass der Sättigungsgrad von TrpB2o mit Serin sehr gering ist. Die hohe Affinität für Indol und die niedrige Affinität für Serin lassen vermuten, dass Indol ein echtes Substrat von TrpB2o Proteinen ist und dass das zweite Substrat nicht Serin, sondern ein anderer Metabolit „X“ ist und diese gemeinsam zum Produkt „Y“ umgesetzt werden (Abbildung 70).

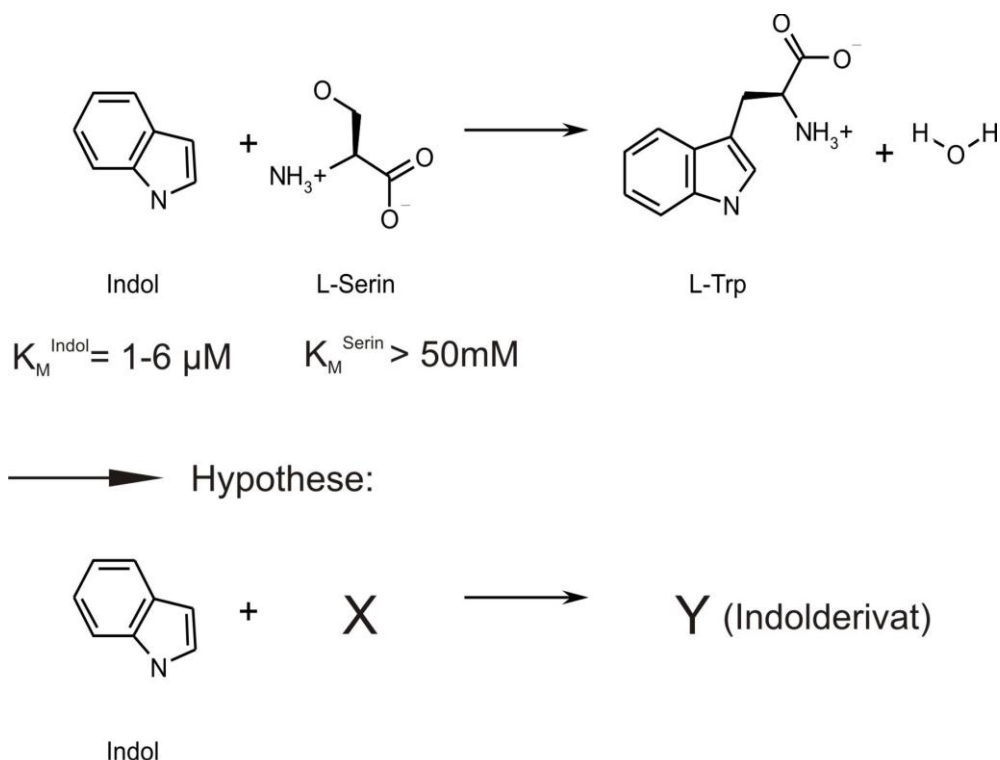


Abbildung 70: Hypothese zur Funktion von TrpB2o auf der Basis der Michaelis-Menten Konstanten für Indol und Serin.

4.2.6 Akkumulation potenzieller Substrate und Produkte von TrpB2o in Zellextrakten von *T. kodakaraensis*

Die Funktion von TrpB2o könnte durch Kenntnis von „Y“ höchstwahrscheinlich annotiert werden, da sich „X“ von „Y“ ableitet. Nachdem anzunehmen ist, dass „Y“ ein Indolderivat ist, sollte es die charakteristische Fluoreszenz des Indolkerns aufweisen, welche einen sehr empfindlichen Marker zur Identifizierung darstellt. Durch die chromatographische Analyse mit RP-HPLC und den Vergleich der vorkommenden Indolderivate in Zellextrakten aus *T. kodakaraensis* Wildtyp und ΔtrpB2o könnten also potenzielle Kandidaten für Y identifiziert werden (Abbildung 71).

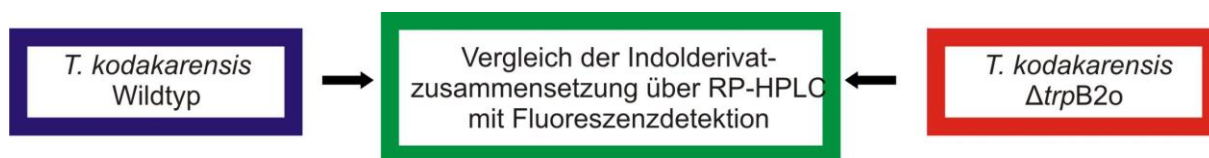


Abbildung 71: Experimenteller Ansatz zur Nutzung der charakteristischen Indolfluoreszenz für die Identifizierung des potenziellen TrpB2o-Produktes „Y“.

Dabei stellen Substanzen, die nur im Wildtyp und nicht in ΔtrpB2o gefunden werden, Kandidaten für Y dar. Umgekehrt könnte es sich bei in der Deletionsmutante angehäuften Substanzen um X handeln.

Um eine optimale Auflösung der chromatographischen Trennung verschiedener Indolderivate zu gewährleisten, wurde eine HPLC Methode unter Verwendung einer *reversed phase* Säule entwickelt (Abbildung 72).

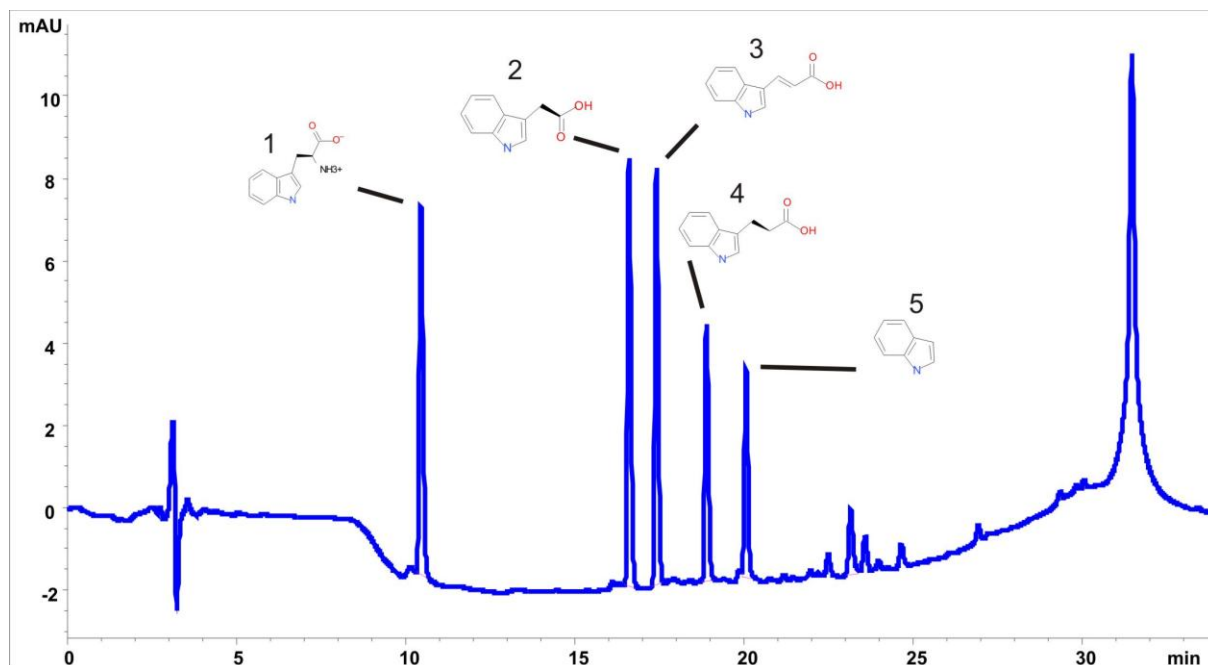


Abbildung 72: Auftrennung verschiedener Indolderivate mit Hilfe der entwickelten HPLC Methode.

Elutionsprofil eines *reversed phase* HPLC Laufs von 10 µl einer Mischung aus je 20 µM L-Tryptophan (1), Indolessigsäure (2), Indolacrylsäure (3), Indolpropansäure (4) und Indol (5). Experimentelle Bedingungen: Die Elution erfolgte über eine Gemini NX C18 150x3mm Säule (Phenomenex) mit 3µm Partikelgröße und wurde durch Absorptionsmessung bei 278 nm verfolgt. Die Chromatographie wurde mit Programm 1 (Kapitel 3.5.11) durchgeführt.

Die Trennschärfe der Methode ist ausreichend um Indolderivate zu trennen, die sich lediglich in einer einzelnen Methylengruppe unterscheiden (vgl. Substanzen 2 und 4). Es zeigte sich, dass die in Abbildung 72 gezeigten Indole sehr gut in Methanol löslich sind. Deshalb wurde dieses Lösungsmittel für die Herstellung von Gesamtzellextrakten aus *T. kodakaraensis* Wildtyp und $\Delta trpB2o$ verwendet (3.2.12), um anschließend die Zusammensetzung an Indolderivaten in diesen Proben zu vergleichen. Aufgrund der geringen Zelldichte, die *T. kodakaraensis* im Vergleich zu beispielsweise *E. coli* erreicht, wurden im Biotechnikum der Universität Regensburg mit Unterstützung von Thomas Hader und Konrad Eichinger Fermentationen im 100 l Maßstab durchgeführt. Für die Quantifizierung der Indolderivate von wildtypischen und $\Delta trpB2o$ Zellen wurden die Extrakte auf das eingewogene Frischgewicht normiert. Um sicherzustellen, dass die Normierung nicht durch stark unterschiedlichen Restwassergehalt, oder durch den im Medium kolloidal gelösten Schwefel verfälscht wird, wurde zusätzlich der Proteingehalt der normierten Proben verglichen (Abbildung 73).

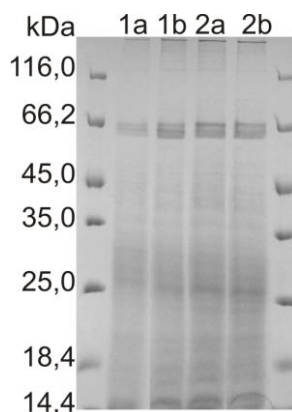


Abbildung 73: Auf die Zelleinwaage normierte Proteinextrakte aus *T. kodakaraensis*.

Je zweimal 50-100 mg (Frischgewicht) *T. kodakaraensis* KU216 Wildtyp und *T. kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB2o$ aus der Fermentation wurden in auf die Zelleinwaage normierten Volumina an denaturierendem Lysepuffer aufgeschlossen und der Proteingehalt des Rohextrakts über SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) verglichen. 1a und b: Je 5 μ l eines auf das Frischgewicht normierten, unabhängig hergestellten Gesamtzellextrakts von KU216 Wildtyp 2a und b: Je 5 μ l eines auf das Frischgewicht normierten, unabhängig hergestellten Gesamtzellextrakts von KU216 $\Delta trpB2o$. Die Herstellung der Extrakte ist in Kapitel 3.2.12 beschrieben.

Der Vergleich der auf das Frischgewicht normierten Rohextrakte von Wildtyp (Spur 1 a und b) und $\Delta trpB2o$ (Spur 2 a und b) zeigt, dass der Proteingehalt der Proben recht ähnlich ist. Daraus kann gefolgert werden, dass die Normierung auf das Frischgewicht einen quantitativen Vergleich der Indolderivatzusammensetzung der beiden methanolischen Extrakte erlaubt.

Die auf das Frischgewicht normierten, methanolischen Extrakte wurden nun über *reversed phase*-HPLC analysiert (Abbildung 74).

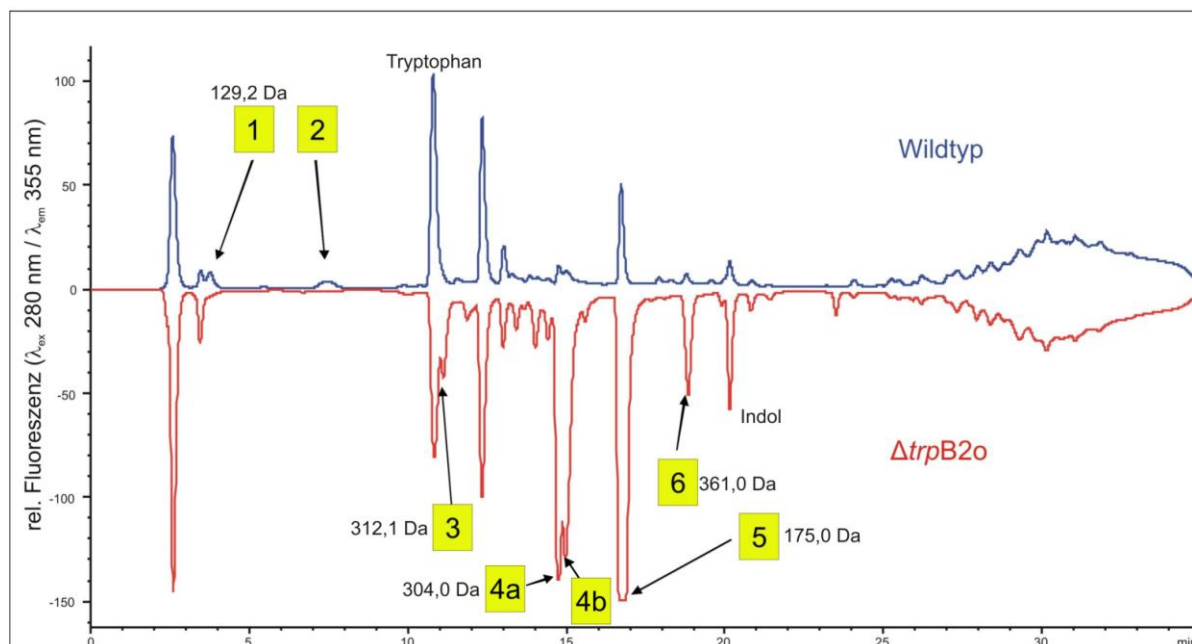


Abbildung 74: Quantitativer Vergleich und Massenbestimmung fluoreszierender Metabolite in methanolischen Extrakten aus *T. kodakaraensis* KU216 Wildtyp und $\Delta trpB2o$.

Elutionsprofile (in Spiegeldarstellung) von *reversed phase* HPLC Läufen von je 20 μ l methanolischem Extrakt aus Wildtyp (blau) und $\Delta trpB2o$ Zellen (rot). Die nummerierten *peaks* markieren Unterschiede zwischen den beiden Extrakten. Die Elution erfolgte über eine Gemini NX C18 150x3mm Säule (Phenomenex) mit 3 μ m Partikelgröße und wurde durch Messung der spezifischen Indolfluoreszenzemission bei 355 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Chromatographie wurde mit Programm 1 (Kapitel 3.5.11) durchgeführt. Die Massen der Substanzen wurden über LC ESI-MS im positiven und negativen Ionisationsmodus bestimmt (Anhang 6.6). Von den Substanzen 2 und 4b konnte keine Masse bestimmt werden, Substanz 7 zeigte keine Ionisation. Letztere wurde durch Co-Chromatographie mit einem Indolstandard als Indol identifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Identität von Tryptophan wurde durch Massenspektrometrie (Anhang 6.6) und Co-Chromatographie mit einem Tryptophanstandard bestätigt.

Der Vergleich der Elutionsprofile zeigt, dass sich Wildtyp und $\Delta trpB2o$ Zellen in ihrem Gehalt an Metaboliten mit spezifischer Indolfluoreszenz deutlich unterscheiden. So sind im wildtypischen Extrakt zwei früh eluierende und somit relativ hydrophile fluoreszierende Metabolite enthalten, die in der Deletionsmutante nicht nachweisbar sind (*peaks* 1 und 2). Diese Substanzen 1 oder 2 könnten das Produkt Y der gesuchten TrpB2o Reaktion darstellen. Dagegen enthält der Extrakt der $\Delta trpB2o$ Zellen sechs Substanzen, die im Wildtyp nicht (*peak* 3) oder in deutlich geringeren Mengen (*peaks* 4a und 4b, 5, 6 und 7) vorhanden sind. Durch Vergleich der über Integration erhaltenen *peak*-Flächen zeigt sich, dass Substanz 4a um den Faktor 14, Substanz 4b um den Faktor 8, Substanz 5 um den Faktor 18, Substanz 6 um den Faktor 6 und Substanz 7 um den Faktor 3 zwischen $\Delta trpB2o$ und dem Wildtyp differieren. Diese Substanzen könnten putative Substrate X des TrpB2o Enzyms sein, welche sich im $\Delta trpB2o$ Stamm akkumulieren.

Um die Identität dieser Metabolite aufzuklären, wurden von Josef Kiermaier (Zentrale Massenanalytik, NWF IV der Universität Regensburg) massenspektrometrische Messungen mit einem Flüssigkeitschromatographie-gekoppelten Elektronenspray-Ionisations-

Massenspektrometer (LC ESI-MS) durchgeführt. Für die chromatographische Trennung der Extrakte wurde dieselbe Säule und die gleichen Bedingungen wie bei den in Abbildung 74 gezeigten Läufen verwendet. Allerdings konnte aufgrund der geringen Konzentration bzw. Überlagerung mit anderen *peaks* während der Elution für die Substanzen 2 und 4b keine Massen bestimmt werden. Die Auswertung der Spektren der anderen Substanzen (siehe Anhang 6.6) zeigte, dass es sich bei allen um niedermolekulare handelt, die eine molare Masse im Bereich von Tryptophan ($M=204$ Da) haben (Abbildung 74).

Metabolit 1, welcher sich in den Wildtypzellen akkumuliert, weist eine Masse von 129,2 Da auf, was einer Differenz von 12,1 Da zu unsubstituiertem Indol entspräche. Die Metabolite 3 bis 6 weisen Massen von 312,1 , 304,0 , 175,0 und 361,0 Da auf und zeigen eine Hydrophobizität, die zwischen der von Tryptophan und Indol liegt. Der Tryptophan-*peak* ist markiert und wurde durch LC-ESI MS (Anhang 6.6) und Co-Chromatographie des Extrakts mit einem internen Tryptophanstandard identifiziert (Daten nicht gezeigt). Der ebenfalls markierte Indol-*peak* wurde nur durch Co-Chromatographie des Extrakts mit einem internen Indolstandard identifiziert (Daten nicht gezeigt), da eine massenspektrometrische Untersuchung aufgrund der fehlenden Ionisierbarkeit des reinen Indolrings nicht möglich war. Um weitere Informationen über die Identität der Metabolite zu gewinnen, wurden Fragmentierungsstudien über Tandem Massenspektrometrie (LC ESI MS-MS) durchgeführt. Dabei werden durch Kollision mit einem Stoßgas Molekülionenfragmente erzeugt, aus deren Masse Strukturinformationen über Analyten gewonnen werden können. Aufgrund der hohen Selektivität der verwendeten Fluoreszenzdetektionsmethode sind Substanzen, die gemeinsam mit den fluoreszierenden Analyten eluieren, nicht sichtbar. Diese stören allerdings die Massenanalytik, weshalb lediglich vom Haupt-*peak* der Deletionsmutante (Substanz 5, 175 Da) ein Stoßspektrum generiert werden konnte (Abbildung 75).

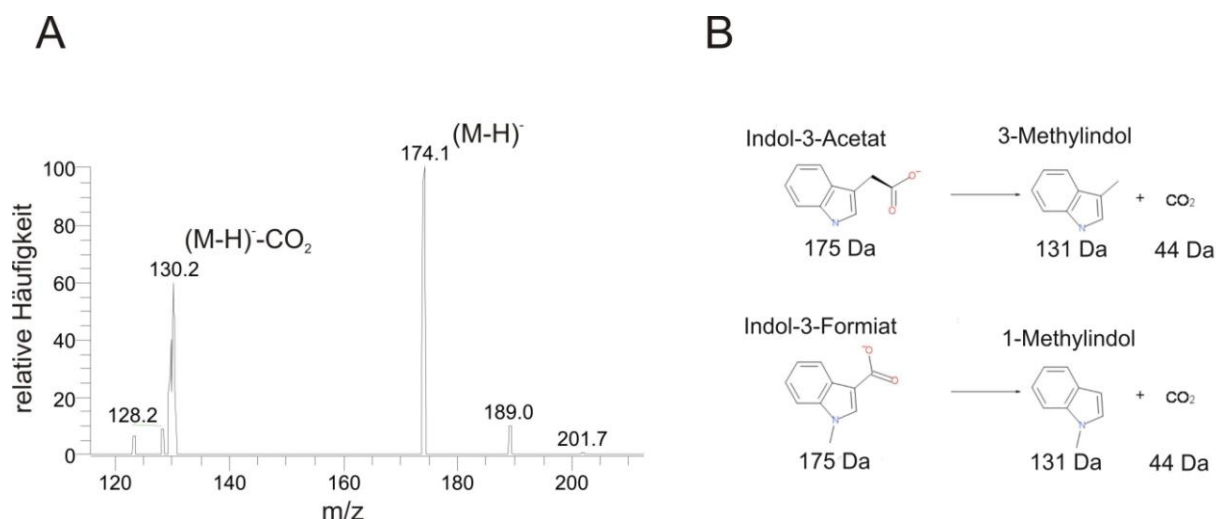


Abbildung 75: MS-MS Analyse des im $\Delta trpB2o$ Stamm akkumulierenden Metaboliten 5 der Masse 175 Da.

A Fragmentationsserie des im negativen Ionenmodus gestoßenen deprotonierten Haupt-*peaks* $(M-H)^-$. Das Fragment m/z 130,2 unterscheidet sich um 44 Da vom Haupt-*peak*, was der Abspaltung von COO^- entspricht. Das Fragment hat die Masse von Methylindol. **B** Mögliche Interpretationen des Fragmentierungsmusters.

Das Fragmentierungsmuster (Abbildung 75 A) deutet darauf hin, dass ein Carboxylat-Ion ($M=44$ Da) abgespalten wird und das erhaltene Fragment mit $M=131$ Da eine Methylindol-Verbindung sein könnte. Da Indol-3-Essigsäure (Auxin) in Co-Chromatographie Experimenten gleichzeitig mit der untersuchten Substanz eluierte (Daten nicht gezeigt), könnte es sich bei Metabolit 5 um sie handeln. Neben dieser als Pflanzenhormon bekannten Substanz passt das Fragmentierungsmuster auch zu Methylindol-Ameisensäure (Abbildung 75 B). Auxin wurde bereits früher in organischen Extrakten aus Archaeen nachgewiesen. So kommt es in *S. acidocaldarius* in einer 1000 mal höher Konzentration vor, als in Pflanzen (White, 1987). Es wurde postuliert, dass Auxin gemeinsam mit seinem Oxidationsprodukt 2-(Indol-3-ylmethyl)indol-3-yllessigsäure, welches in *S. acidocaldarius* ebenfalls nachgewiesen wurde, als primitives System zum Schutz vor toxischem Sauerstoff wirkt. Interessanterweise enthält *S. acidocaldarius* im Gegensatz zu *S. solfataricus* kein *trpB2o* Gen, was die Anhäufung von Auxin erklären könnte und es zu einem guten Kandidaten für das Substrat X macht. Dagegen spricht jedoch, dass in *Halobacterium salinarium*, das ebenfalls kein *trpB2o* enthält, kein Auxin nachgewiesen werden konnte (White, 1987). Ein Aktivitätstest von tmTrpB2o mit Indol-3-essigsäure und dem zweiten Trp-Substrat Serin bei 80 °C gab keine Hinweise auf eine enzymatische Reaktion.

In höheren Pflanzen wirkt Auxin in vielfältiger und komplexer Weise als Regulator der Transkription unterschiedlichster Gene (Vanneste & Friml, 2009). Um zu untersuchen, ob Auxin auch in hyperthermophilen Prokaryoten eine ähnliche Wirkungsweise hat, wurden die zellulären Mengen an tmTrpB1 und tmTrpB2o in *T. maritima*, der wie *T. kodakaraensis* mit einem Operon-ständigen *trpB1* und einem *trpB2o* ausgestattet ist, in An- und Abwesenheit von Auxin über quantitative Western Blots mit entsprechenden Antikörpern (3.5.6) bestimmt.

Eine Regulation der Expression von tmTrpB1 und tmTrpB2 in *T. maritima* durch Auxin konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit ist unklar, ob das im $\Delta trpB2o$ Stamm in großen Mengen überrepräsentierte Auxin ähnlich wie in Pflanzen, als Transkriptionsregulator wirkt. Die Identität der anderen potentiellen Substrate X, deren Masse bestimmt wurde, konnte durch Vergleich mit verschiedenen Metabolitdatenbanken nicht eindeutig geklärt werden. Hier sind weitere strukturelle Analysen, z. B. durch NMR Spektroskopie oder hochauflösende Massenspektrometrie erforderlich.

Es stellt sich die Frage, warum im wildtypischen Extrakt kaum Indolderivate akkumulieren, welche als Produkt Y der TrpB2o Reaktion in Frage kommen. Häufig wirken Indol und seine Derivate extrazellulär als Signalmoleküle, sie werden also an die Umgebung abgegeben und wären somit nicht mehr im Zellextrakt zu finden. So reguliert beispielsweise Indol, welches durch das Enzym Tryptophanase aus Tryptophan gebildet wird, die Expression von Genen und die Bildung von Biofilmen in *E. coli* (Lee et al., 2009; Wang et al., 2001). In Mais dient sezerniertes Indol und dessen Derivat DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on) zur Abwehr von Fressfeinden, Pilzen und Bakterien (Frey et al., 2000). Deshalb wurde untersucht, ob sich die Metabolitzusammensetzung der Fermentationsüberstände von wildtypischen und $\Delta trpB2o$ Zellen unterscheidet. Dazu wurden die wässrigen Überstände einer erschöpfenden Extraktion mit organischen Lösungsmitteln steigender Hydrophilie (Chloroform/ NH_3 →Ethylacetat→1-Butanol) unterzogen und sowohl die organischen Phasen als auch die wässrige Phase zur Trockene eingengt (3.2.12). Die Rückstände wurden in Methanol aufgenommen, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernt und erneut in Acetonitril gelöst. Somit wurden für Wildtyp und $\Delta trpB2o$ Zellen je acht Extrakte (Chloroform/ NH_3 Phase in Methanol oder Acetonitril, Ethylacetatphase in Methanol oder Acetonitril, 1-Butanolphase in Methanol oder Acetonitril, wässrige Phase in Methanol oder Acetonitril) hergestellt, die paarweise über *reversed phase* HPLC mit Fluoreszenzdetektion und Diodenarray Detektion verglichen wurden.

Es zeigte sich, dass die in Methanol gelösten Extraktionsrückstände bereits alle bei 280 nm absorbierenden oder indolspezifische Fluoreszenz aufweisenden Metabolite enthielten, d. h. durch Lösen der in Methanol unlöslichen Rückstände in Acetonitril konnten keine weiteren Metabolite detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da alle als Referenzsubstanzen getesteten Indolderivate eine sehr gute Löslichkeit in Methanol und Acetonitril zeigten, wurden keine weiteren, hydrophoberen Lösungsmittel getestet.

Der paarweise Vergleich der in Methanol gelösten Rückstände der Extraktionen von Wildtyp und $\Delta trpB2o$ mittels *reversed phase* HPLC und Detektion der indolspezifischen Fluoreszenz zeigte nur wenige Unterschiede zwischen den Extrakten. Lediglich im Ethylacetat-Extrakt trat eine fluoreszierende Substanz auf, die im $\Delta trpB2o$ Stamm sezerniert wird und im Wildtyp vollständig fehlt (Abbildung 76).

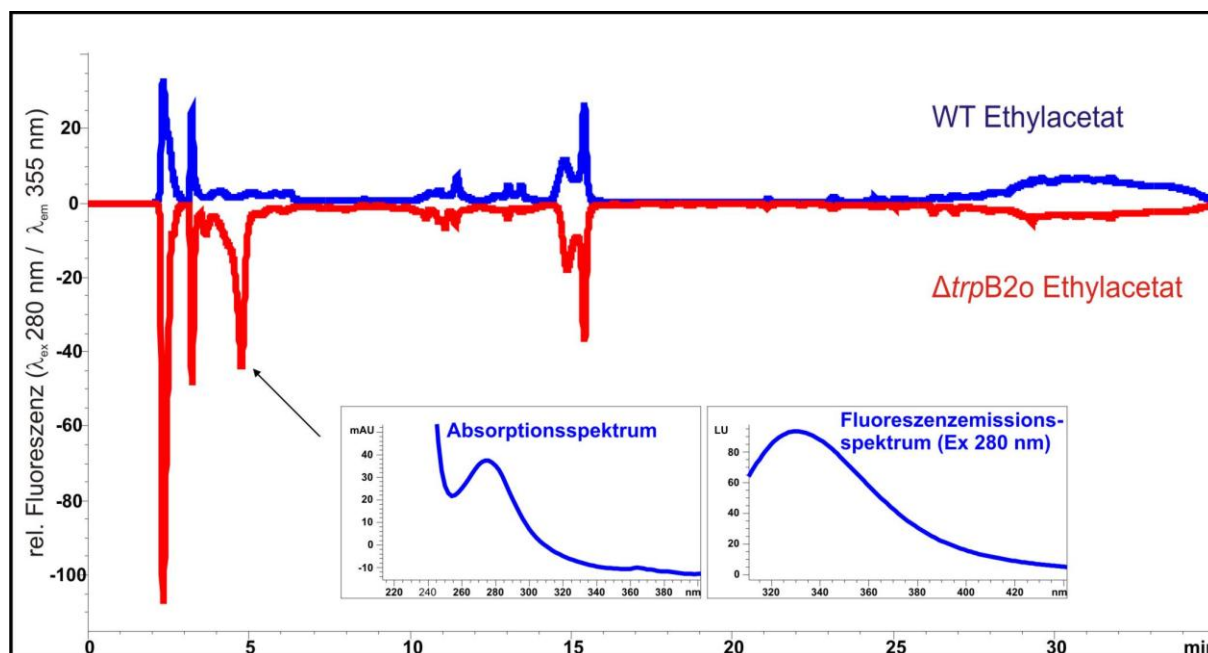


Abbildung 76: Quantitativer Vergleich fluoreszierender Metabolite in Ethylacetat-Extrakten aus *T. kodakaraensis* KU216 Wildtyp und $\Delta trpB2o$ Fermentationsüberständen.

Elutionsprofile (in Spiegeldarstellung) von *reversed phase* HPLC Läufen von je 20 μ l in MeOH gelöstem Ethylacetat-Extrakten aus Wildtyp (blau) und $\Delta trpB2o$ Zellüberständen (rot) (3.2.12). Der mit Pfeil markierte Metabolit findet sich nur im $\Delta trpB2o$ Stamm, seine Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren sind als Insets gezeigt. Die Elution erfolgte über eine Gemini NX C18 150x3mm Säule (Phenomenex) mit 3 μ m Partikelgröße und wurde durch Messung der spezifischen Indolfluoreszenzemission bei 355 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Chromatographie wurde mit Programm 1 (Kapitel 3.5.11) durchgeführt.

Die Substanz zeigt ein für Indolderivate typisches Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum. Allerdings konnte keine massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden, da die Substanz gleichzeitig mit einem weiteren Metaboliten eluiert, der eine starke Ionisierbarkeit aufweist und somit das Signal der gesuchten Substanz überdeckt. Durch Optimierung der chromatographischen Bedingungen könnte das in der Deletionsmutante akkumulierende, potenzielle Indolderivat X einer massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich werden.

Verfolgt man dagegen die HPLC-Elution der organischen Extrakte der Fermenterüberstände über die Messung der Absorption bei 280 nm statt über indolspezifische Fluoreszenzdetektion, so zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta trpB2o$ Stamm (Abbildung 77).

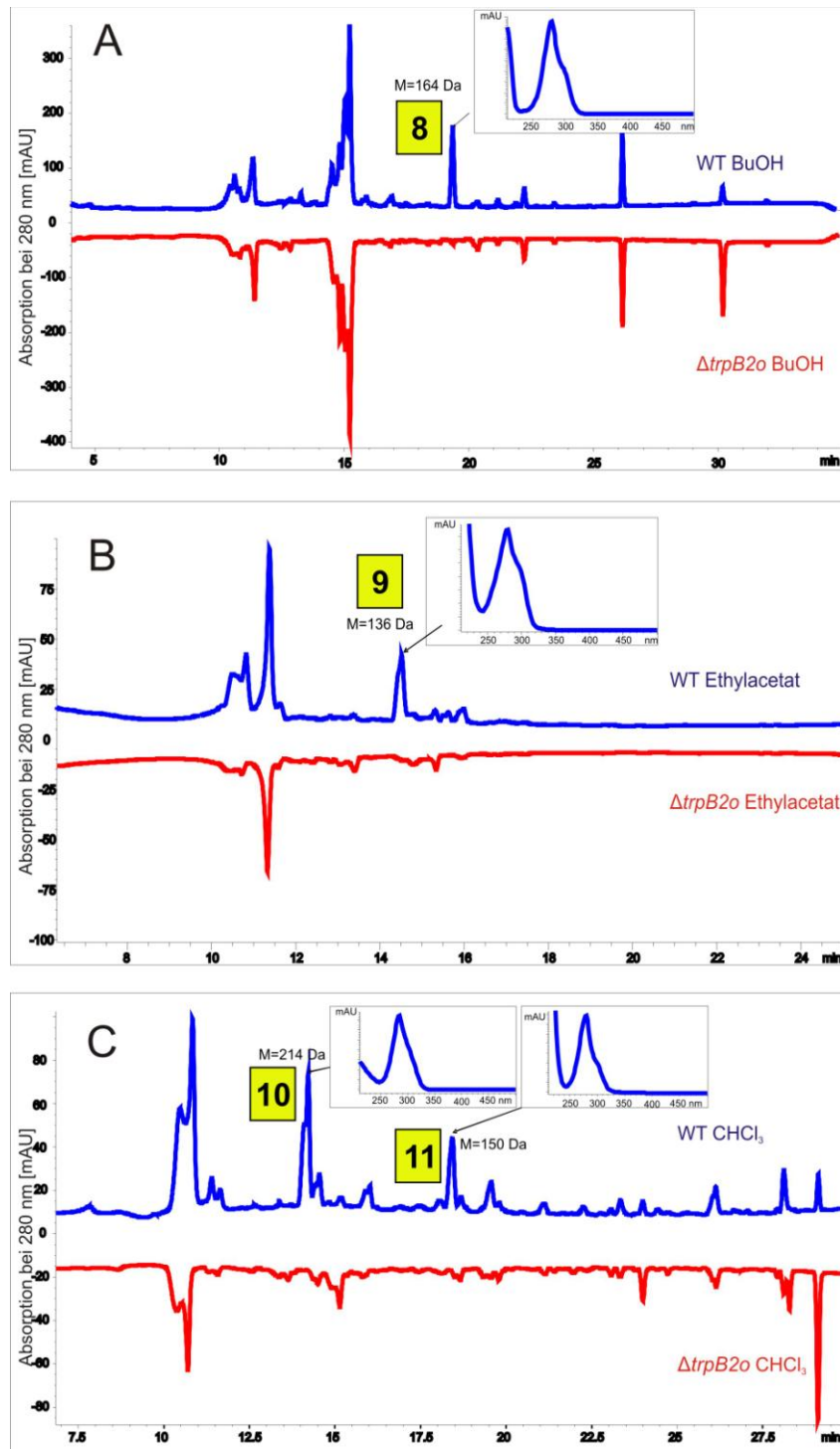


Abbildung 77: Quantitativer Vergleich von bei 280 nm absorbierenden Metaboliten in organischen Extrakten aus Fermentationsüberständen von *T. kodakaraensis* KU216 Wildtyp und $\Delta trpB2o$.

Elutionsprofile (in Spiegeldarstellung) von *reversed phase* HPLC Läufen von je 20 μ l in MeOH gelöstem Buthanol-Extrakten (A), Ethylacetat-Extrakten (B) und Chloroform-Extrakten (C) aus Wildtyp (blau) und $\Delta trpB2o$ Zellüberständen (rot) (3.2.12). Die markierten Metabolite finden sich nur im Wildtyp, ihre Absorptionsspektren sind als Insets gezeigt. Die annotierten Molmassen wurden durch LC ESI-MS ermittelt (Massenspektren in Anhang 6.6). Die Elution erfolgte über eine Gemini NX C18 150x3mm Säule (Phenomenex) mit 3 μ m Partikelgröße und wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Chromatographien für die Ethylacetat-, Buthanol- und wässrigen Extrakte wurden mit Programm 1, diejenigen für die Chloroform Extrakte mit Programm 2 durchgeführt (Kapitel 3.5.11).

So finden sich insgesamt vier Metabolite in den wildtypischen Fermentationsüberständen, die im $\Delta trpB2o$ Stamm fehlen. Diese weisen sehr ähnliche Absorptionsspektren mit Maxima um 275 nm und einer Schulter um 305 nm auf (Abbildung 77 Insets), zeigen aber keine indolspezifische Fluoreszenz. Die über LC-ESI MS ermittelten Molekulargewichte liegen bei 136, 150, 164 und 214 Da (Massenspektren siehe Anhang 6.6). Aufgrund der fehlenden Fluoreszenzeigenschaften kann davon ausgegangen werden, dass diese Metabolite keinen oder einen stark modifizierten Indolring beinhalten. Die Akkumulation in den wildtypischen Überständen und das Fehlen in den Überständen des $\Delta trpB2o$ Stamms macht diese Metabolite nichtsdestotrotz zu Kandidaten für direkte Produkte Y oder Folgeprodukte der TrpB2o Reaktion.

Um weitere Strukturinformationen zu gewinnen, wurden Fragmentierungsstudien dieser vier Moleküle über Tandem Massenspektrometrie (LC ESI MS-MS) durchgeführt (Abbildung 78).

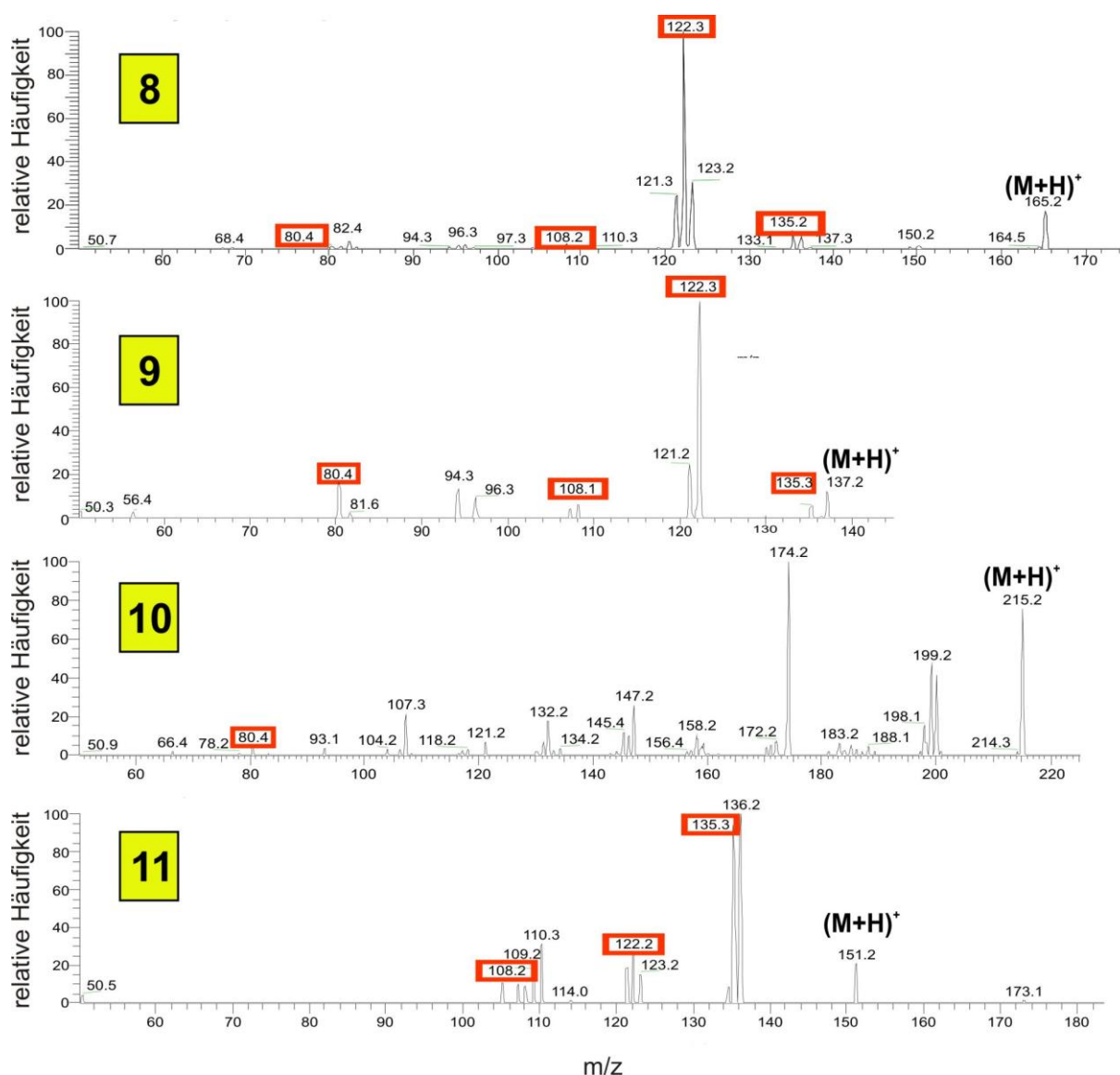


Abbildung 78: MS-MS Analyse der im Fermentationsüberstand des Wildtyp Stammes akkumulierten Metabolite.

Gezeigt sind Fragmentationsserien der im positiven Ionenmodus gestoßenen, protonierten Hauptpeaks $(M+H)^+$ der Metabolite 8 bis 11 (vgl. Abbildung 77). Die rot markierten Fragmente treten wiederholt als Zerfallsprodukte verschiedener Ausgangssubstanzen auf.

Keiner der vier Metabolite lieferte Fragmentationsserien, die auf einen Indolkern des Moleküls hindeuten würden. Dagegen führte die Fragmentierung zu mehreren Zerfallsprodukten, die den vier Molekülen gemeinsam sind. So tritt ein Fragment mit m/z 80,4 in allen vier Metaboliten auf und den Metaboliten 8,9 und 11 ist eine Fragmentationsserie mit m/z ~135,2, ~122,2 und ~108,2 gemeinsam. Dies ist ein klarer Beleg für die strukturelle Verwandtschaft der vier Substanzen, die im Wildtyp sezerniert werden, dem $\Delta trpB2o$ Stamm aber fehlen. Es handelt sich somit um putative Produkte Y oder Produktnachfolger der TrpB2o Reaktion, die wohl keine einfachen Indolderivate sind. Das würde bedeuten, dass der Indolkern durch TrpB2o oder durch ein Folgeenzym in seiner Grundstruktur modifiziert wird, wie es beispielsweise auch bei der Biosynthese von DIMBOA der Fall ist (Frey et al., 2000). Mit den vorliegenden Daten ist keine sichere Identifikation dieser Moleküle möglich.

Um die Reaktion von TrpB2o und deren metabolischen Kontext aufzuklären, ist die Identifikation der Substanzen 1 bis 11 nötig. Dazu sollen in weiterführenden Experimenten über präparative HPLC größere Mengen der Reinsubstanzen gewonnen werden (Kapitel 3.5.11, Programm 3), um sie über NMR-Spektroskopie und hochauflösende Massenspektrometrie näher charakterisieren zu können. Dies scheiterte bisher an der ungenügenden Reinheit der isolierten Stoffe, wodurch keine auswertbaren Spektren erhalten wurden. Deshalb ist eine weitere Optimierung des Reinigungsverfahrens nötig. Als Alternative zu einer Reinigung kann die Bestimmung der exakten Massen über hochauflösende LC-QTOF Massenspektrometrie durchgeführt werden. Dies ist ein Verfahren, bei dem sich die Summenformeln der Reinsubstanzen und die Summenformeln der einzelnen Fragmente der MS-MS Analyse während der chromatographischen Trennung im analytischen Maßstab bestimmen lassen (Lee et al., 2006; Van Nieuwerburgh et al., 2006).

4.2.7 Abschließende Diskussion zu den Funktionsuntersuchungen an TrpB2o

Die heute verfügbare Technik erlaubt es, mikrobielle Genome innerhalb weniger Tage vollständig zu sequenzieren, weshalb derzeit mehr als 1000 Genome verschiedener Bakterien und Archaeen verfügbar sind (Stand: Dezember 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj>). Jedoch wird die biologische Relevanz dieser enormen Menge an Information erst deutlich, wenn Gene in den Genomen identifiziert und den codierten Proteinen eine Funktion zugeordnet werden kann. Viele Genprodukte können aufgrund von Sequenz- oder Strukturähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Proteinen

relativ sicher funktionell annotiert werden. Allerdings ist sogar bei der bestuntersuchten bakteriellen Spezies, *E. coli*, die Funktion von lediglich 66 % aller codierten Proteine bekannt, wohingegen die restlichen 34 % funktionell nicht charakterisiert sind (Hu et al., 2009)

Insbesondere die Entdeckung neuer Enzyme verspricht Einblicke in bisher unbekannte Bereiche des zellulären Metabolismus und in die molekulare Evolution von Proteinen bis hin zur Identifikation neuer *drug targets* (Allen, 2007). Jedoch ist die Aufklärung von Enzymfunktionen aufgrund der Vielfalt an Metaboliten, die auch schon in relativ einfachen Bakterienzellen auftreten, eine anspruchsvolle Aufgabe mit bisher überschaubarem Erfolg. Die Erfolgsquote für Funktionsaufklärungen kann erhöht werden, indem man sich auf Enzyme aus Superfamilien fokussiert, die mechanistisch ähnliche Reaktionen katalysieren. In solchen Fällen ist die Identifizierung des Substrates gleichbedeutend mit der Identifizierung der katalysierten Reaktion (Allen, 2007). Auf diese Weise konnten beispielsweise vorher uncharakterisierten Mitgliedern der Enolase- und Amidohydrolase Superfamilien neue Funktionen in bis dahin unbekannten Stoffwechselwegen zugeordnet werden (Hermann et al., 2007; Song et al., 2007). Diese Studien basierten auf *in silico docking*-Experimenten von putativen Substraten oder Reaktionsintermediaten in Röntgenkristallstrukturen oder Homologiemodellen der untersuchten Enzyme. Durch diese Vorgehensweise konnten die Autoren aus tausenden potenzieller Substrate die besten Kandidaten eingrenzen und experimentell testen, was schließlich zum Erfolg führte.

Für die Funktionsaufklärung der TrpB2o Enzyme wurde der Suchraum für Substrate der Reaktion über einen anderen Ansatz eingegrenzt. Dabei wurden bioinformatische, biochemische und genetische Methoden kombiniert.

In einem bioinformatischen Ansatz zur funktionellen Annotation von TrpB2o wurde der genomische Kontext (Overbeek et al., 1999) von *trpB2o* Genen durch Dr. Rainer Merkl mit dem Programm AMIGOS (Merkl, 2006) analysiert. AMIGOS konnte jedoch keine konservierten Gennachbarschaften für *trpB2o* detektieren, wodurch die Vorhersage einer physiologischen Funktion nicht möglich war (R. Merkl, unpublizierte Daten).

Obwohl die Produkte der nicht *trp*-Operon-ständigen *trpB2o* und *trpB2a* Gene ca. 30 %ige Sequenzidentitäten zu der sehr gut charakterisierten β -Untereinheit der Tryptophan Synthase (TrpB1) aufweisen und die katalytisch essentiellen Reste konserviert sind (Kapitel 1.4), ergab die biochemische Charakterisierung der rekombinant hergestellten tmTrpB2o und sTrpB2a Proteine keine Hinweise auf funktionale oder physikalische Interaktionen mit ihren jeweiligen TrpA Proteinen (Hettwer & Sterner, 2002; Leopoldseder et al., 2006). Interaktionsstudien von sTrpB2a und tmTrpB2o in Zellextrakten aus *S. solfataricus* und *T. maritima* lassen vermuten, dass beide Proteine wohl auch *in vivo* keine hochaffinen

Interaktionen mit TrpA oder mit anderen, bisher unbekannten Proteinen zeigen (Kapitel 4.2.2).

Trotzdem katalysieren TrpB2o/TrpB2a Enzyme die TrpB Teilreaktion, wenn auch mit niedriger katalytischer Effizienz (Hettwer & Sterner, 2002; Leopoldseder et al., 2006). Um beurteilen zu können, ob diese Aktivität auch *in vivo* Relevanz für die Tryptophan Biosynthese hat, wurden mit genetischen Methoden die *T. kodakaraensis* Stämme $\Delta trpB1$ und $\Delta trpB2o$ erstellt und bezüglich ihres Wachstumsverhaltens charakterisiert (Kapitel 4.2.3 und 4.2.4) Es zeigte sich, dass $\Delta trpB2o$ und der wildtypische Stamm sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Tryptophan keinen Unterschied im Wachstumsverhalten zeigten, während $\Delta trpB1$ in Abwesenheit von Tryptophan nicht überlebensfähig war. Daraus lässt sich folgern, dass die *in vitro* beobachtete Tryptophan Synthase Aktivität von TrpB2o *in vivo* keine Relevanz hat und *trpB2o* ein fehlendes *trpB1* Gen nicht funktionell ersetzen kann.

Bei Betrachtung der enzymkinetischen Parameter der gereinigten Proteine fällt auf, dass der sehr niedrige K_M^{Indol} eine herausragende Eigenschaft der TrpB2o/TrpB2a Enzyme ist. Im Gegensatz dazu sind die K_M^{Ser} Werte extrem hoch (50 bis 150 mM). Diese hohe Affinität für Indol und die niedrige Affinität für Serin lassen vermuten, dass Indol oder ein Indolderivat das physiologische Substrat der TrpB2o Enzyme darstellt und das zweite Substrat ein anderer Metabolit als Serin ist. Als Produkt der Reaktion wäre damit ein von Tryptophan abweichendes Indolderivat zu erwarten. Die wohl wichtigste Klasse der Indolderivate stellen die sogenannten Indolalkaloide dar. Alkaloide sind basische, stickstoffhaltige Heterozyklen, die meist aus Aminosäuren in komplexen, sekundären Stoffwechselwegen synthetisiert werden, die nur teilweise bekannt sind. In Pflanzen wurden bisher mehr als 12000 Alkaloide mit vielfältigen Funktionen identifiziert, welche von der Abwehr von Fressfeinden und Pathogenen bis hin zu Wachstumsregulatoren reichen. Viele Alkaloide zeigen auch eine charakteristische physiologische Wirkung auf den menschlichen Organismus und werden seit dem Altertum als pharmazeutische Wirkstoffe, Stimulantien, Drogen und Gifte benutzt (Bowsher et al., 2008; Richter, 1996). Die Indolalkaloide gelten mit über 3000 bekannten Substanzen als eine der größten Klassen der Alkaloide, die sowohl bei Pflanzen, Pilzen als auch bei Bakterien gefunden werden. Bei den Pflanzen finden sich die effektivsten Produzenten in den Familien der *Apocynaceae*, *Loganiaceae* und *Rubiaceae* (Richter, 1996). Bei den Pilzen bilden *Aspergillus*, *Penicillium* und vor allem *Claviceps* Indolalkaloide, bei den Bakterien wurden sie in Actinomyceten und Cyanobakterien nachgewiesen (Li, 2009). Bei den Archaeen konnte bisher lediglich in *S. acidocaldarius* das einfache Indolalkaloid Indol-3-essigsäure und dessen Oxidationsprodukt 2-(Indol-3-ylmethyl)indol-3-yllessigsäure identifiziert werden, wobei deren Funktion weitgehend unklar ist (White, 1987). Die Biosynthese von Indolalkaloiden in Pflanzen, Pilzen und Bakterien geht von der Aminosäure Tryptophan oder dessen Vorläufern aus (De Luca & Laflamme, 2001). Die an

der Biosynthese der Alkaloide beteiligten Enzyme entstanden häufig durch Genduplikation und Diversifizierung (Ober, 2005). So ist beispielsweise in Pflanzen Indol die Ausgangssubstanz für die Synthese der zyklischen hydroxamischen Säure DIMBOA, welches zur Abwehr von Fressfeinden, Pilzen und Bakterien dient (Frey et al., 2000). In Mais existiert für dessen Biosynthese ein zur Tryptophan Synthase α -Untereinheit homologes Protein (BX1) welches IGP effizient zu Indol hydrolysieren kann, ohne eine Interaktion mit der entsprechenden β -Untereinheit der Tryptophan Synthase einzugehen. Es wird angenommen, dass das *trpA* Gen dupliziert und modifiziert wurde, um ein Enzym für den von Indol abgeleiteten Sekundärmetabolismus bereitzustellen, während der ursprüngliche Tryptophan Synthase Komplex für die Synthese von Tryptophan erhalten blieb (Kulik et al., 2005).

Um das bei der TrpB2o Reaktion gebildete Indolderivat zu identifizieren, wurde das charakteristische Fluoreszenzsignal des Indolrings als Indikator genutzt. Dazu wurden organische Extrakte von *T. kodakaraensis* Wildtyp und $\Delta trpB2o$ bezüglich ihrer Zusammensetzung an Metaboliten mit charakteristischer Indolfluoreszenz über *reversed phase* HPLC verglichen. Es zeigte sich, dass mehrere dieser Metabolite in der Deletionsmutante akkumulieren (Abbildung 74). Die Annahme liegt nahe, dass es sich dabei um potenzielle Substrate der TrpB2o Reaktion handelt, die sich in Abwesenheit des Enzyms anhäufen. Es konnten aber auch zwei fluoreszierende Metabolite im wildtypischen Extrakt gefunden werden, die in der Deletionsmutante nicht nachweisbar waren und somit mögliche Kandidaten für das Produkt der Reaktion sind (Abbildung 74, Substanzen 1 und 2). Der Vergleich der Zellüberstände von Wildtyp und $\Delta trpB2o$ zeigte keine Akkumulation eines fluoreszierenden Indolderivats im wildtypischen Extrakt, allerdings konnte eine deutliche Anreicherung von vier strukturell verwandten, nicht-fluoreszierenden, niedermolekularen Metaboliten nachgewiesen werden (Abbildung 77 und Abbildung 78). Bei diesen handelt es sich um putative Produkte oder Produktnachfolger der TrpB2o Reaktion, die wegen der fehlenden Fluoreszenz wohl keine einfachen Abkömmlinge von Indol sind. Das deutet darauf hin, dass der Indolkern durch TrpB2o oder durch ein Folgeenzym in seiner Grundstruktur modifiziert wird, wie es beispielsweise auch bei der Biosynthese von DIMBOA der Fall ist (Frey et al., 2000).

Eine Identifizierung der akkumulierenden Substanzen der zellulären Fraktion war bisher nur teilweise möglich. So konnte lediglich der Haupt-*peak* des Extrakts der Deletionsmutante über massenspektrometrische Untersuchungen als Indol-3-Essigsäure oder Methylandolameisensäure identifiziert werden. Die anderen Substanzen eluierten in zu geringen Konzentrationen bzw. gemeinsam mit Verunreinigungen von der Säule, um eine an Flüssigkeitschromatographie gekoppelte MS-MS Fragmentierungsstudie durchführen zu können. Die Menge und Reinheit der akkumulierenden Substanzen des wildtypischen

Zellüberstands dagegen war ausreichend für Fragmentierungsstudien (Abbildung 78). Diese zeigten, dass es sich um strukturell eng verwandte Moleküle handelt. Allerdings konnten die Stoffe für eine endgültige Identifizierung über NMR nicht in ausreichender Reinheit gewonnen werden. In Zukunft sollte eine Vorreinigung und Anreicherung der entsprechenden Substanzen über semi-präparative HPLC durchgeführt werden. Die entsprechenden Fraktionen könnten anschließend über ein LC-hybrid-Quadrupol *time of flight* Massenspektrometer im TOF Modus analysiert werden, welches eine Genauigkeit von 0,001 Da erreicht. Die genaue Massenbestimmung würde die empirische Summenformel der unbekannten Substanzen liefern, so die Zahl der strukturellen Möglichkeiten einschränken und die Suche in entsprechenden Datenbanken ermöglichen (Lee et al., 2006; Van Nieuwerburgh et al., 2006). Auch eine Inkubation von rekombinant hergestelltem TrpB2o mit den $\Delta trpB2o$ Zellextrakten, welche die potenziellen Substrate der Reaktion enthalten, wäre ein vielversprechender Ansatz. Dabei könnte sich das Elutionsprofil durch die von TrpB2o katalysierte Reaktion verändern, wobei der Substrat-*peak* abnehmen und der Produkt-*peak* neu entstehen sollte. Um eingrenzen zu können, welche der Substanzen, die sich im Wildtyp und der Deletionsmutante unterscheiden, direkt an der Reaktion des TrpB2o Enzyms beteiligt sind, sollten die metabolischen Studien mit einem anderen Organismus, der *trpB2o* bzw. *trpB2a* enthält, wiederholt werden. Dazu wurde bereits der Stamm $\Delta trpB2a$ des hyperthermophilen Crenarchaeons *Sulfolobus solfataricus* in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Albers (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) hergestellt. Sollte der Vergleich von *S. solfataricus* Wildtyp und $\Delta trpB2a$ bezüglich des Gehalts an Indolderivaten Überschneidungen mit den Studien an *T. kodakaraensis* zeigen, wäre dies für die Identifikation der an der Reaktion beteiligten Moleküle sehr hilfreich.

Im Zusammenhang mit der Funktionsaufklärung von TrpB2o stellt sich die Frage, ob eine Deletion des Gens unter bestimmten Bedingungen nicht doch einen Phänotyp hervorrufen kann. So wurde bisher nicht überprüft, ob $\Delta trpB2o$ Zellen bei veränderten Inkubationstemperaturen oder unterschiedlichen Nährmedien (beispielsweise Vollmedium ohne Schwefel) eine Änderung des Wachstumsverhaltens im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Auch eine morphologische Charakterisierung der Zellen über Elektronenmikroskopie sollte noch durchgeführt werden. Es zeigte sich nämlich, dass gleiche Zellzahlen von $\Delta trpB2o$ und Wildtyp deutlich in ihrem Proteingehalt abweichen (der Wildtyp enthält ca. dreimal mehr Protein als die Deletionsmutante, Daten nicht gezeigt), was ein Hinweis auf eine veränderte Größe der Zellen, also unterschiedliches Teilungsverhalten ist.

Bereits weit fortgeschritten ist der Vergleich des Proteoms von *T. kodakaraensis* $\Delta trpB2o$ und Wildtyp. In Zusammenarbeit von Dr. Astrid Bruckmann (Arbeitsgruppe Prof. Deutzmann, Lehrstuhl Biochemie I, Universität Regensburg) wurden vergleichende Proteomanalysen mit Hilfe von 2D-PAGE und MALDI-TOF Massenspektrometrie durchgeführt. Es zeigten sich

deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Proteoms im Zuckerstoffwechsel, der Aminosäurebiosynthese, der Purinbiosynthese und Proteinen des Zellzyklus. Eine statistisch signifikante, abschließende Bewertung der Daten kann erst nach Reproduktion der Experimente erfolgen und sollte weitere Aufschlüsse über die physiologische Relevanz von TrpB2o liefern. Durch diese Experimente könnte die Reaktion des Enzyms direkt in Zusammenhang mit dem Gesamtmetabolismus gebracht und Hinweise auf weitere unbekannte Enzyme eines neuen Sekundärstoffwechselwegs in Archaeen gefunden werden.

5 Literaturverzeichnis

- Ahmed, S. A., Hyde, C. C., Thomas, G., und Miles, E. W. (1987). Microcrystals of tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex from *Salmonella typhimurium* are catalytically active. *Biochemistry* 26, 5492-5498.
- Ahmed, S. A., und Miles, E. W. (1994). Aliphatic alcohols stabilize an alternative conformation of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 269, 16486-16492.
- Albers, S. V., und Driessen, A. M. (2002). Signal peptides of secreted proteins of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: a genomic survey. *Arch Microbiol* 177, 209-216.
- Albers, S. V., Jonuscheit, M., Becker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampe, R., Driessen, A. J. M., und Schleper, C. (2006a). Homologous and heterologous expression of proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl Environ Microbiol* 72, 102-111.
- Albers, S. V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampe, R., Driessen, A. J., und Schleper, C. (2006b). Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl Environ Microbiol* 72, 102-111.
- Allen, K. N. (2007). Form finds function. *Nat Chem Biol* 3, 452-453.
- Anderson, K. S., Miles, E. W., und Johnson, K. A. (1991). Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. A novel intersubunit triggering mechanism. *J Biol Chem* 266, 8020-8033.
- Appleby, T. C., Mathews, II, Porcelli, M., Cacciapuoti, G., und Ealick, S. E. (2001). Three-dimensional structure of a hyperthermophilic 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 276, 39232-39242.
- Argos, P. (1988). An investigation of protein subunit and domain interfaces. *Protein Eng* 2, 101-113.
- Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M., und Imanaka, T. (2004). Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* 1, 263-267.
- Banner, D. W., Bloomer, A., Petsko, G. A., Phillips, D. C., und Wilson, I. A. (1976). Atomic coordinates for triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 72, 146-155.
- Barends, T. R., Domratcheva, T., Kulik, V., Blumenstein, L., Niks, D., Dunn, M. F., und Schlichting, I. (2008). Structure and mechanistic implications of a tryptophan synthase quinonoid intermediate. *Chembiochem* 9, 1024-1028.
- Bartholmes, P., Böker, H., und Jaenicke, R. (1979). Purification of tryptophan synthase from *Saccharomyces cerevisiae* and partial activity of its nicked subunits. *Eur J Biochem* 102, 167-172.
- Beismann-Driemeyer, S., und Sterner, R. (2001). Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the holoenzyme complex. *J Biol Chem* 276, 20387-20396.

- Bell, S. D., Botting, C. H., Wardleworth, B. N., Jackson, S. P., und White, M. F. (2002). The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science* 296, 148-151.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., und Rabinowitz, J. D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 5, 593-599.
- Berkner, S., und Lipps, G. (2008). Genetic tools for *Sulfolobus* spp.: vectors and first applications. *Arch Microbiol* 190, 217-230.
- Bolz, C. (2006) Mutationsanalyse zur Identifizierung der strukturellen Grundlage einer spezifischen Protein-Protein Interaktion, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Bowsher, C., Steer, M., und Tobin, A. (2008). *Plant Biochemistry*, 15 edn (New York, Garland Science).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradshaw, R. A., Brickey, W. W., und Walker, K. W. (1998). N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* 23, 263-267.
- Brown, E. A., D'Ari, R., und Newman, E. B. (1990). A relationship between L-serine degradation and methionine biosynthesis in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* 136, 1017-1023.
- Brzovic, P. S., Ngo, K., und Dunn, M. F. (1992). Allosteric interactions coordinate catalytic activity between successive metabolic enzymes in the tryptophan synthase holoenzyme complex. *Biochemistry* 31, 3831-3839.
- Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Bertoldo, C., De Rosa, M., und Zappia, V. (1994). Purification and characterization of extremely thermophilic and thermostable 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Purine nucleoside phosphorylase activity and evidence for intersubunit disulfide bonds. *J Biol Chem* 269, 24762-24769.
- Chothia, C., und Janin, J. (1975). Principles of protein-protein recognition. *Nature* 256, 705-708.
- Condo, I., Ruggero, D., Reinhardt, R., und Londei, P. (1998). A novel aminopeptidase associated with the 60 kDa chaperonin in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 29, 775-785.
- Crawford, I. P., und Ito, J. (1964). Serine Deamination by the B Protein of *Escherichia coli* Tryptophan Synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 390-397.
- Creighton, T. E., und Yanofsky, C. (1966). Association of the alpha and beta-2 subunits of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 241, 980-990.
- De Felice, M., Esposito, L., Pucci, B., Carpentieri, F., De Falco, M., Rossi, M., und Pisani, F. M. (2003). Biochemical characterization of a CDC6-like protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 278, 46424-46431.
- de Koning, T. J., Snell, K., Duran, M., Berger, R., Poll-The, B. T., und Surtees, R. (2003). L-serine in disease and development. *Biochem J* 371, 653-661.

- De Luca, V., und Laflamme, P. (2001). The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 4, 225-233.
- Dierkers, A. T., Niks, D., Schlichting, I., und Dunn, M. F. (2009). Tryptophan Synthase: Structure and Function of the Monovalent Cation Site. *Biochemistry*.
- Drewe, W. F., Jr., und Dunn, M. F. (1985). Detection and identification of intermediates in the reaction of L-serine with *Escherichia coli* tryptophan synthase via rapid-scanning ultraviolet-visible spectroscopy. *Biochemistry* 24, 3977-3987.
- Dunn, M. F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe, W. F., Jr., Houben, K. F., Leja, C. A., und Roy, M. (1990). The tryptophan synthase holoenzyme complex transfers indole between the alpha- and beta-sites via a 25-30 Å long tunnel. *Biochemistry* 29, 8598-8607.
- Dunn, M. F., Niks, D., Ngo, H., Barends, T. R., und Schlichting, I. (2008). Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine. *Trends Biochem Sci* 33, 254-264.
- Edman, P., und Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1, 80-91.
- Eichler, J., und Adams, M. W. (2005). Posttranslational protein modification in Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 393-425.
- Elferink, M. G., Albers, S. V., Konings, W. N., und Driessen, A. J. (2001). Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. *Mol Microbiol* 39, 1494-1503.
- Fan, Y. X., McPhie, P., und Miles, E. W. (2000). Regulation of tryptophan synthase by temperature, monovalent cations, and an allosteric ligand. Evidence from Arrhenius plots, absorption spectra, and primary kinetic isotope effects. *Biochemistry* 39, 4692-4703.
- Febbraio, F., Andolfo, A., Tanfani, F., Briante, R., Gentile, F., Formisano, S., Vaccaro, C., Scire, A., Bertoli, E., Pucci, P., und Nucci, R. (2004). Thermal stability and aggregation of *sulfolobus solfataricus* beta-glycosidase are dependent upon the N-epsilon-methylation of specific lysyl residues: critical role of in vivo post-translational modifications. *J Biol Chem* 279, 10185-10194.
- Feese, M. D., Kato, Y., Tamada, T., Kato, M., Komeda, T., Miura, Y., Hirose, M., Hondo, K., Kobayashi, K., und Kuroki, R. (2000). Crystal structure of glycosyltrehalose trehalohydrolase from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol* 301, 451-464.
- Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., und Kaneshiro, E. S. (1995). Uptake and metabolism of L-serine by *Pneumocystis carinii carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 42, 669-675.
- Frey, M., Stettner, C., Pare, P. W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H., und Gierl, A. (2000). An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14801-14806.
- Fujino, A., Ose, T., Yao, M., Tokiwano, T., Honma, M., Watanabe, N., und Tanaka, I. (2004). Structural and enzymatic properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *J Mol Biol* 341, 999-1013.
- Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S., und Imanaka, T. (2005). Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res* 15, 352-363.

- Gast, D. A., Jenal, U., Wasserfallen, A., und Leisinger, T. (1994). Regulation of tryptophan biosynthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J Bacteriol* 176, 4590-4596.
- Goldberg, M. E., York, S., und Stryer, L. (1968). Fluorescence studies of substrate and subunit interactions of the beta-2 protein of *Escherichia coli* tryptophan synthetase. *Biochemistry* 7, 3662-3667.
- Grabowski, B., und Kelman, Z. (2001). Autophosphorylation of archaeal Cdc6 homologues is regulated by DNA. *J Bacteriol* 183, 5459-5464.
- Grishin, N. V., Phillips, M. A., und Goldsmith, E. J. (1995). Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci* 4, 1291-1304.
- Grogan, D. W. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J Bacteriol* 171, 6710-6719.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hartl, F. U., und Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R., und Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *Embo J* 18, 6744-6751.
- Hatfield, G. W., und Umbarger, H. E. (1971). L-Threonine desaminase, biosynthetic. In *Methods in Enzymology*, M. Tabor, und C. W. Tabor, eds. (New York, Academic Press), pp. 561-566.
- Hermann, J. C., Marti-Arbona, R., Fedorov, A. A., Fedorov, E., Almo, S. C., Shoichet, B. K., und Raushel, F. M. (2007). Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *Nature* 448, 775-779.
- Hettwer, S., und Sterner, R. (2002). A novel tryptophan synthase beta-subunit from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and putative physiological role. *J Biol Chem* 277, 8194-8201.
- Heyn, M. P., und Weischet, W. O. (1975). Circular dichroism and fluorescence studies on the binding of ligands to the alpha subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry* 14, 2962-2968.
- Hiraga, K., und Yutani, K. (1996). A thermodynamic analysis of conformational change due to the alpha 2 beta 2 complex formation of tryptophan synthase. *Eur J Biochem* 240, 63-70.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., und Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Holtzhauer, M. (1996). *Methoden in der Proteinanalytik* (Berlin, Springer).
- Houben, K. F., und Dunn, M. F. (1990). Allosteric effects acting over a distance of 20-25 Å in the *Escherichia coli* tryptophan synthase holoenzyme complex increase ligand affinity and cause redistribution of covalent intermediates. *Biochemistry* 29, 2421-2429.
- Hu, P., Janga, S. C., Babu, M., Diaz-Mejia, J. J., Butland, G., Yang, W., Pogoutse, O., Guo, X., Phanse, S., Wong, P., et al. (2009). Global functional atlas of *Escherichia coli* encompassing previously uncharacterized proteins. *PLoS Biol* 7, e96.

- Huang, X., Holden, H. M., und Raushel, F. M. (2001). Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 70, 149-180.
- Huber, R., Langworthy, T., König, H., Thomm, M., Woese, C., Sleytr, U., und Stetter, K. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represent a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144, 324-333.
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W., und Davies, D. R. (1988). Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 263, 17857-17871.
- Isupov, M. N., Fleming, T. M., Dalby, A. R., Crowhurst, G. S., Bourne, P. C., und Littlechild, J. A. (1999). Crystal structure of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol* 291, 651-660.
- Janin, J. (1995). Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics. *Biochimie* 77, 497-505.
- Janin, J. (1997). Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nat Struct Biol* 4, 973-974.
- Jhee, K. H., McPhie, P., Ro, H. S., und Miles, E. W. (1998). Tryptophan synthase mutations that alter cofactor chemistry lead to mechanism-based inactivation. *Biochemistry* 37, 14591-14604.
- Jones, S., und Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13-20.
- Jones, S., und Thornton, J. M. (1997). Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *J Mol Biol* 272, 121-132.
- Keskin, O., Ma, B., und Nussinov, R. (2005). Hot regions in protein-protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *J Mol Biol* 345, 1281-1294.
- Kirschner, K., Weischet, W. O., und Wiskocil, R. L. (1975a). Protein-Ligand Interactions. In *Protein-Ligand Interactions*, H. Sund, und G. Glaver, eds. (Berlin, de Gruyter), pp. 27-44.
- Kirschner, K., Wiskocil, R. L., Foehn, M., und Rezeau, L. (1975b). The tryptophan synthase from *Escherichia coli*. An improved purification procedure for the alpha-subunit and binding studies with substrate analogues. *Eur J Biochem* 60, 513-523.
- Knöchel, T., Ivens, A., Hester, G., Gonzalez, A., Bauerle, R., Wilmanns, M., Kirschner, K., und Jansonius, J. N. (1999). The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9479-9484.
- Kulik, V., Hartmann, E., Weyand, M., Frey, M., Gierl, A., Niks, D., Dunn, M. F., und Schlichting, I. (2005). On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes. *J Mol Biol* 352, 608-620.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., und Sigler, P. B. (1994). Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369, 621-628.

- Lamm, O. (1929). Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung. *Ark Mat Astr Fys* 21B, 1-4.
- Landi, L., Pasquali, P., und Marchetti, M. (1966). Folic acid and biotin on the metabolism of 1 carbon unit: utilization of beta-carbon of serine for the synthesis of methionine. *Experientia* 22, 362-363.
- Lane, A. N. (1982). The dependence of flux, sensitivity and response of the flux on the concentrations of substrate and modifiers for cooperative enzymes. *J Theor Biol* 99, 491-508.
- Lane, A. N., Paul, C. H., und Kirschner, K. (1984). The mechanism of self-assembly of the multi-enzyme complex tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *EMBO J* 3, 279-287.
- Lebowitz, J., Lewis, M. S., und Schuck, P. (2002). Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci* 11, 2067-2079.
- Lee, J., Maeda, T., Hong, S. H., und Wood, T. K. (2009). Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acetylhomoserine lactones. *Appl Environ Microbiol* 75, 1703-1716.
- Lee, K. C., Cheuk, M. W., Chan, W., Lee, A. W., Zhao, Z. Z., Jiang, Z. H., und Cai, Z. (2006). Determination of glucosinolates in traditional Chinese herbs by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 386, 2225-2232.
- Leja, C. A., Woehl, E. U., und Dunn, M. F. (1995). Allosteric linkages between beta-site covalent transformations and alpha-site activation and deactivation in the tryptophan synthase holoenzyme complex. *Biochemistry* 34, 6552-6561.
- Leopoldseder, S. (2005) Neuartige Tryptophansynthase aus Hyperthermophilen: Charakterisierung der Enzyme aus *Sulfolobus solfataricus*, Dissertation, Universität Regensburg.
- Leopoldseder, S., Hettwer, S., und Sterner, R. (2006). Evolution of multi-enzyme complexes: the case of tryptophan synthase. *Biochemistry* 45, 14111-14119.
- Li, S. M. (2009). Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat Prod Rep* 27, 57-78.
- Lin, Z., und Rye, H. S. (2006). GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 211-239.
- Lo Conte, L., Chothia, C., und Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 285, 2177-2198.
- Lower, B. H., Bischoff, K. M., und Kennelly, P. J. (2000). The archaeon *Sulfolobus solfataricus* contains a membrane-associated protein kinase activity that preferentially phosphorylates threonine residues in vitro. *J Bacteriol* 182, 3452-3459.
- Lower, B. H., und Kennelly, P. J. (2002). The membrane-associated protein-serine/threonine kinase from *Sulfolobus solfataricus* is a glycoprotein. *J Bacteriol* 184, 2614-2619.
- Lower, B. H., Potters, M. B., und Kennelly, P. J. (2004). A phosphoprotein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* with protein-serine/threonine kinase activity. *J Bacteriol* 186, 463-472.

- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., und Hakoshima, T. (1999). The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol Cell* 4, 793-803.
- Mamolo, M. G., Zampieri, D., Zanette, C., Florio, C., Collina, S., Urbano, M., Azzolina, O., und Vio, L. (2008). Substituted benzylaminoalkylindoles with preference for the sigma2 binding site. *Eur J Med Chem* 43, 2073-2081.
- Marabotti, A., Cozzini, P., und Mozzarelli, A. (2000). Novel allosteric effectors of the tryptophan synthase alpha(2)beta(2) complex identified by computer-assisted molecular modeling. *Biochim Biophys Acta* 1476, 287-299.
- Maras, B., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., De Rosa, M., Bossa, F., Scandurra, R., und Barra, D. (1992). The protein sequence of glutamate dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*, a thermoacidophilic archaebacterium. Is the presence of N-epsilon-methyllysine related to thermostability? *Eur J Biochem* 203, 81-87.
- Martusewitsch, E., Sensen, C. W., und Schleper, C. (2000). High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. *J Bacteriol* 182, 2574-2581.
- Mayer, M. P., und Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
- Merkl, R. (2006). AMIGOS: a method for the inspection of genomic organisation or structure and its application to characterise conserved gene arrangements. *In Silico Biol* 6, 281-306.
- Merkl, R. (2007). Modelling the evolution of the archeal tryptophan synthase. *BMC Evol Biol* 7, 59.
- Miles, E. W. (1979). Tryptophan synthase: structure, function, and subunit interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 49, 127-186.
- Miles, E. W., Rhee, S., und Davies, D. R. (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274, 12193-12196.
- Mintseris, J., und Weng, Z. (2005). Structure, function, and evolution of transient and obligate protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10930-10935.
- Moll, R., und Schäfer, G. (1988). Chemiosmotic H⁺ cycling across the plasma membrane of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett* 232, 359-363.
- Morales, R., Charon, M. H., Kachalova, G., Serre, L., Medina, M., Gomez-Moreno, C., und Frey, M. (2000). A redox-dependent interaction between two electron-transfer partners involved in photosynthesis. *EMBO Rep* 1, 271-276.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., und Imanaka, T. (1994). Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl Environ Microbiol* 60, 4559-4566.
- Mozzarelli, A., Peracchi, A., Rossi, G. L., Ahmed, S. A., und Miles, E. W. (1989). Microspectrophotometric studies on single crystals of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex demonstrate formation of enzyme-substrate intermediates. *J Biol Chem* 264, 15774-15780.
- Mullis, K. B., und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., und Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247, 536-540.
- Nagata, S., Hyde, C. C., und Miles, E. W. (1989). The alpha subunit of tryptophan synthase. Evidence that aspartic acid 60 is a catalytic residue and that the double alteration of residues 175 and 211 in a second-site revertant restores the proper geometry of the substrate binding site. *J Biol Chem* 264, 6288-6296.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., *et al.* (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323-329.
- Ngo, H., Kimmich, N., Harris, R., Nicks, D., Blumenstein, L., Kulik, V., Barends, T. R., Schlichting, I., und Dunn, M. F. (2007). Allosteric regulation of substrate channeling in tryptophan synthase: modulation of the L-serine reaction in stage I of the beta-reaction by alpha-site ligands. *Biochemistry* 46, 7740-7753.
- Nooren, I. M., und Thornton, J. M. (2003a). Diversity of protein-protein interactions. *Embo J* 22, 3486-3492.
- Nooren, I. M., und Thornton, J. M. (2003b). Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J Mol Biol* 325, 991-1018.
- Ober, D. (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci* 10, 444-449.
- Ogasahara, K., Hiraga, K., Ito, W., Miles, E. W., und Yutani, K. (1992). Origin of the mutual activation of the alpha and beta 2 subunits in the alpha 2 beta 2 complex of tryptophan synthase. Effect of alanine or glycine substitutions at proline residues in the alpha subunit. *J Biol Chem* 267, 5222-5228.
- Ogasahara, K., Ishida, M., und Yutani, K. (2003). Stimulated interaction between and subunits of tryptophan synthase from hyperthermophile enhances its thermal stability. *J Biol Chem* 278, 8922-8928.
- Osborne, A., Teng, Q., Miles, E. W., und Phillips, R. S. (2003). Detection of open and closed conformations of tryptophan synthase by ¹⁵N-heteronuclear single-quantum coherence nuclear magnetic resonance of bound 1-¹⁵N-L-tryptophan. *J Biol Chem* 278, 44083-44090.
- Overbeek, R., Fonstein, M., D'Souza, M., Pusch, G. D., und Maltsev, N. (1999). The use of gene clusters to infer functional coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2896-2901.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., und Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- Pan, P., und Dunn, M. F. (1996). beta-Site covalent reactions trigger transitions between open and closed conformations of the tryptophan synthase holoenzyme complex. *Biochemistry* 35, 5002-5013.
- Pan, P., Woehl, E., und Dunn, M. F. (1997). Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem Sci* 22, 22-27.
- Peracchi, A., Bettati, S., Mozzarelli, A., Rossi, G. L., Miles, E. W., und Dunn, M. F. (1996). Allosteric regulation of tryptophan synthase: effects of pH, temperature, and alpha-subunit

ligands on the equilibrium distribution of pyridoxal 5'-phosphate-L-serine intermediates. *Biochemistry* 35, 1872-1880.

Peracchi, A., Mozzarelli, A., und Rossi, G. L. (1995). Monovalent cations affect dynamic and functional properties of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex. *Biochemistry* 34, 9459-9465.

Phillips, R. S., McPhie, P., Miles, E. W., Marchal, S., und Lange, R. (2008a). Quantitative effects of allosteric ligands and mutations on conformational equilibria in *Salmonella typhimurium* tryptophan synthase. *Arch Biochem Biophys* 470, 8-19.

Phillips, R. S., Miles, E. W., Holtermann, G., und Goody, R. S. (2005). Hydrostatic pressure affects the conformational equilibrium of *Salmonella typhimurium* tryptophan synthase. *Biochemistry* 44, 7921-7928.

Phillips, R. S., Miles, E. W., McPhie, P., Marchal, S., Georges, C., Dupont, Y., und Lange, R. (2008b). Pressure and temperature jump relaxation kinetics of the conformational change in *Salmonella typhimurium* tryptophan synthase L-serine complex: large activation compressibility and heat capacity changes demonstrate the contribution of solvation. *J Am Chem Soc* 130, 13580-13588.

Pierce, M. M., Raman, C. S., und Nall, B. T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* 19, 213-221.

Rabinowitz, J. D., und Kimball, E. (2007). Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*. *Anal Chem* 79, 6167-6173.

Raushel, F. M., Thoden, J. B., und Holden, H. M. (2003). Enzymes with molecular tunnels. *Acc Chem Res* 36, 539-548.

Ravnikar, P. D., und Somerville, R. L. (1987). Genetic characterization of a highly efficient alternate pathway of serine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169, 2611-2617.

Reichmann, D., Rahat, O., Cohen, M., Neuvirth, H., und Schreiber, G. (2007). The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr Opin Struct Biol* 17, 67-76.

Reinstein, J., Vetter, I. R., Schlichting, I., Rosch, P., Wittinghofer, A., und Goody, R. S. (1990). Fluorescence and NMR investigations on the ligand binding properties of adenylate kinases. *Biochemistry* 29, 7440-7450.

Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A., und Wittinghofer, A. (2001). Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell* 105, 245-255.

Rhee, S., Miles, E. W., Mozzarelli, A., und Davies, D. R. (1998). Cryocrystallography and microspectrophotometry of a mutant (alpha D60N) tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex reveals allosteric roles of alpha Asp60. *Biochemistry* 37, 10653-10659.

Rhee, S., Parris, K. D., Ahmed, S. A., Miles, E. W., und Davies, D. R. (1996). Exchange of K⁺ or Cs⁺ for Na⁺ induces local and long-range changes in the three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha2beta2 complex. *Biochemistry* 35, 4211-4221.

Rhee, S., Parris, K. D., Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Miles, E. W., und Davies, D. R. (1997). Crystal structures of a mutant (betaK87T) tryptophan synthase alpha2beta2 complex with ligands bound to the active sites of the alpha- and beta-subunits reveal ligand-induced conformational changes. *Biochemistry* 36, 7664-7680.

- Richter, G. (1996). *Biochemie der Pflanzen*, 6 edn (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Rowlett, R., Yang, L. H., Ahmed, S. A., McPhie, P., Jhee, K. H., und Miles, E. W. (1998). Mutations in the contact region between the alpha and beta subunits of tryptophan synthase alter subunit interaction and intersubunit communication. *Biochemistry* 37, 2961-2968.
- Rudolph, J., und Stubbe, J. (1995). Investigation of the mechanism of phosphoribosylamine transfer from glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase to glycylamide ribonucleotide synthetase. *Biochemistry* 34, 2241-2250.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sarkar, G., und Sommer, S. S. (1990). The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8, 404-407.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., und Imanaka, T. (2005). Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl Environ Microbiol* 71, 3889-3899.
- Sawers, G. (1998). The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals. *Arch Microbiol* 171, 1-5.
- Schelert, J., Dixit, V., Hoang, V., Simbahan, J., Drozda, M., und Blum, P. (2004). Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *J Bacteriol* 186, 427-437.
- Schmid, F. X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Proofs of Protein Structure: A practical approach*, T. E. Creighton, ed. (Oxford, IRL Press), pp. 259-295.
- Schneider, T. R., Gerhardt, E., Lee, M., Liang, P. H., Anderson, K. S., und Schlichting, I. (1998). Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry* 37, 5394-5406.
- Schubert, W. D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M. P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., und Heinz, D. W. (2002). Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* 111, 825-836.
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 78, 1606-1619.
- Schwabe, A. (2007) Mutationsanalyse der Komplexbildung von Tryptophan-Synthasen aus *Thermotoga maritima*, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E., und Slatko, B. E. (1992). CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* 13, 626-633.
- Shaw, A., Fortes, P. A., Stout, C. D., und Vacquier, V. D. (1995). Crystal structure and subunit dynamics of the abalone sperm lysin dimer: egg envelopes dissociate dimers, the monomer is the active species. *J Cell Biol* 130, 1117-1125.

- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., *et al.* (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7835-7840.
- Slatko, B. E. (1994). Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 31, 35-45.
- Slotin, L. A. (1977). *Current Methods of Phosphorylation of Biological Molecules*. Synthesis-Stuttgart, 737-752.
- Song, L., Kalyanaraman, C., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Glasner, M. E., Brown, S., Imker, H. J., Babbitt, P. C., Almo, S. C., Jacobson, M. P., und Gerlt, J. A. (2007). Prediction and assignment of function for a divergent N-succinyl amino acid racemase. *Nat Chem Biol* 3, 486-491.
- Stafford, W. F., 3rd (1992). Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal Biochem* 203, 295-301.
- Sterner, R., und Höcker, B. (2005). Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)8-barrel enzyme fold. *Chem Rev* 105, 4038-4055.
- Stewart, V., und Yanofsky, C. (1986). Role of leader peptide synthesis in tryptophanase operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 167, 383-386.
- Studier, F. W., und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Tang, X., Ezaki, S., Fujiwara, S., Takagi, M., Atomi, H., und Imanaka, T. (1999). The tryptophan biosynthesis gene cluster *trpCDEGFBA* from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 is regulated at the transcriptional level and expressed as a single mRNA. *Mol Gen Genet* 262, 815-821.
- Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., *et al.* (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4, 41.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Vadrevu, R., Falzone, C. J., und Matthews, C. R. (2003). Partial NMR assignments and secondary structure mapping of the isolated alpha subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase, a 29-kD TIM barrel protein. *Protein Sci* 12, 185-191.
- Valbuzzi, A., Gollnick, P., Babitzke, P., und Yanofsky, C. (2002). The anti-trp RNA-binding attenuation protein (Anti-TRAP), AT, recognizes the tryptophan-activated RNA binding domain of the TRAP regulatory protein. *J Biol Chem* 277, 10608-10613.
- Van Nieuwerburgh, F. C., Vande Casteele, S. R., Maes, L., Goossens, A., Inze, D., Van Bocxlaer, J., und Deforce, D. L. (2006). Quantitation of artemisinin and its biosynthetic precursors in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography-electrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1118, 180-187.
- Vanneste, S., und Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005-1016.

- Vetter, I. R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J., und Wittinghofer, A. (1999). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature* 398, 39-46.
- Waage, I. (2009) Genetische Transformationsexperimente in *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus kodakaraensis*, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Wang, D., Ding, X., und Rather, P. N. (2001). Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 4210-4216.
- Weischet, W. O., und Kirschner, K. (1976). Steady-state kinetic studies of the synthesis of indoleglycerol phosphate catalyzed by the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. Comparison with the alpha2 beta2-complex. *Eur J Biochem* 65, 375-385.
- Weyand, M., Schlichting, I., Herde, P., Marabotti, A., und Mozzarelli, A. (2002a). Crystal structure of the beta Ser178--> Pro mutant of tryptophan synthase. A "knock-out" allosteric enzyme. *J Biol Chem* 277, 10653-10660.
- Weyand, M., Schlichting, I., Marabotti, A., und Mozzarelli, A. (2002b). Crystal structures of a new class of allosteric effectors complexed to tryptophan synthase. *J Biol Chem* 277, 10647-10652.
- White, R. H. (1987). Indole-3-acetic acid and 2-(indol-3-ylmethyl)indol-3-yl acetic acid in the thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Bacteriol* 169, 5859-5860.
- Wolin, E. A., Wolin, M. J., und Wolfe, R. S. (1963). Formation of Methane by Bacterial Extracts. *J Biol Chem* 238, 2882-2886.
- Xie, G., Forst, C., Bonner, C., und Jensen, R. A. (2002). Significance of two distinct types of tryptophan synthase beta chain in Bacteria, Archaea and higher plants. *Genome Biol* 3, RESEARCH0004.
- Xie, Y., und Reeve, J. N. (2005). Regulation of tryptophan operon expression in the archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *J Bacteriol* 187, 6419-6429.
- Xiu, Z. L., Chang, Z. Y., und Zeng, A. P. (2002). Nonlinear dynamics of regulation of bacterial trp operon: model analysis of integrated effects of repression, feedback inhibition, and attenuation. *Biotechnol Prog* 18, 686-693.
- Yanofsky, C. (2001). Advancing our knowledge in biochemistry, genetics, and microbiology through studies on tryptophan metabolism. *Annu Rev Biochem* 70, 1-37.
- Yanofsky, C. (2003). Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions. *J Biol Chem* 278, 10859-10878.
- Yanofsky, C., und Crawford, I. P. (1972). Tryptophan Synthase. In *The Enzymes*, P. D. Boyer, ed. (New York, Academic Press), pp. 1-31.
- Yphantis, D. (1964). Equilibrium Ultracentrifugation of Dilute Solutions. *Biochemistry* 3, 297-317.
- Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., Kanemoto, K., Matsumoto, M., Tanaka, S., Miyashita, T., Matsushiro, A., Sugino, Y., und Miles, E. W. (1987). Tryptophan synthase alpha subunit glutamic acid 49 is essential for activity. Studies with 19 mutants at position 49. *J Biol Chem* 262, 13429-13433.

Zappacosta, F., Sannia, G., Savoy, L. A., Marino, G., und Pucci, P. (1994). Post-translational modifications in aspartate aminotransferase from *Sulfolobus solfataricus*. Detection of N-epsilon-methyllysines by mass spectrometry. *Eur J Biochem* 222, 761-767.

Zolghadr, B., Weber, S., Szabo, Z., Driessen, A. J., und Albers, S. V. (2007). Identification of a system required for the functional surface localization of sugar binding proteins with class III signal peptides in *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 64, 795-806.

6 Anhang

6.1 Nomenklatur für *trpB* Gene

Die Varianten von *trpB* treten in den verschiedenen Genomen in unterschiedlichen Kombinationen auf. In (Merkl, 2007) wurden mit Hilfe eines Namensschemas eine Klassifikation eingeführt. Die Namen von Genen und Genprodukten wurden dabei nach dem Schema *SPECIES/LOC/TYPE/TAX* klassifiziert. *SPECIES* ist die Abkürzung für die Spezies (siehe unten) und *LOC* steht für die Position des *trpB* Gens relativ zum *trp* Operon, genauer relativ zum *trpA* Gen. Wenn zwei *trpB* Gene in einem Genom vorkommen, werden sie mit *_i* (wenn das Gen innerhalb des *trp* Operons liegt) oder *_o* (wenn es außerhalb des Operons liegt, also sowohl für die phylogenetisch unterscheidbaren *trpB2o* und *trpB2a* Gene, vgl. Abbildung 10) markiert. Kommt nur ein einzelnes *trpB* Gen vor, wird es mit *_s* markiert, wenn es neben *trpA* liegt bzw. mit *_S*, wenn es von *trpA* separiert ist. *TYPE* steht für den Gen-Typ. So steht 1 für *trpB1* und 2 für *trpB2*. Schließlich liefert *TAX* die taxonomische Klassifikation. Es ist C für *Crenarchaeota*, E für *Euryarchaeota* und B für *Bacteria*. Die folgenden Beispiele verdeutlichen die Verwendung des Namensschemas: *Aperni_o2C* wurde für das *trpB2* Gen im Genom von *Aeropyrum pernix* (*Aperni*) verwendet, welches außerhalb des Operons *_o* auftritt und vom Typ *trpB2* (2) ist. Da *A. pernix* ein *Crenarchaeon* ist, endet der Name mit einem C. Die *_o* Notation indiziert, dass ein zweites *trpB* Gen in *A. pernix* existiert. Dieses Gen wurde konsequenterweise *Aperni_i2C* benannt, da es das *trpB2* Gen innerhalb des *trp* Operons ist. In Paaren wie *Tmarit_i1B* und *Tmarit_o2B* liegt ein *trpB1* Gen innerhalb und ein *trpB2* Gen außerhalb des Operons vor. *Sacido_s2C* ist der Name für das *trpB2* Gen innerhalb des Operons. Da *Sulfolobus acidocaldarius* nur ein *trpB* Gen besitzt, wurde es mit *_s* markiert. Da *Thermoplasma volcanium* nur ein *trpB* Gen hat, welches nicht Operon-basiert ist und vom Typ *trpB2*, wurde das Gen *Tvolc_S2E* benannt.

Die Akronyme für den in Abbildung 10 A gezeigten phylogenetischen Baum stehen für folgende Organismen:

Crenarchaeota

Aeropyrum pernix K1 (*Aperni*, NC_00854), *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2 (*Paerop*, NC_003364), *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 (*Sacido*, NC_007181), *Sulfolobus solfataricus* P2 (*Ssolfa*, NC_002754), *Sulfolobus tokodaii* str. 7 (*Stokod*, NC_003106).

Euryarchaeota

Archaeoglobus fulgidus DSM 4304 (*Afulgi*, NC_000917), *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 (*Hmaris*, NC_006396), *Halobacterium* sp. NRC-1 (*Halob*, NC_002607), *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 (*Mjanna*, NC_000909), *Methanococcoides burtonii* DSM 6242 (*Mburto*, NC_007955), *Methanococcus maripaludis* S2 (*Mmarip*,

NC_005791), *Methanopyrus kandleri* AV19 (Mkandl, NC_003551), *Methanosarcina acetivorans* C2A (Maceti, NC_003552), *Methanosarcina barkeri* str. Fusaro (Mbarke, NC_007355), *Methanosarcina mazei* Go1 (Mmazei, NC_003901), *Methanosphaera stadtmanae* DSM 3091 (Mstadt, NC_007681), *Methanospirillum hungatei* JF-1 (Mhunga, NC_007796) *Methanothermobacter thermautotrophicus* str. Delta H. (Mtherm, NC_000916), *Natronomonas pharaonis* DSM 2160 (Nphara, NC_007426), *Picrophilus torridus* DSM9790 (Ptorri, NC_005877), *Pyrococcus abyssi* GE5 (Pabyss, NC_000868), *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 (Pfurio, NC_003413), *Pyrococcus horikoshii* OT3 (Phorik, NC_000961), *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (Tkodak, NC_006624), *Thermoplasma acidophilum* DSM1728 (Tacido, NC_002578), *Thermoplasma volcanium* GSS1 (Tvolca, NC_002689).

Bacteria

Escherichia coli K-12 (Ecoli, NC_000913), *Geobacter metallireducens* GS-15 (Gmetal, NC_007517), *Geobacter sulfurreducens* PCA (Gsulfu, NC_002939), *Thermotoga maritima* (Tmarit, NC_00853).

6.2 Kalibrierung der Superdex 75 HR 10/300 GL Gelfiltrationssäule

Zur Bestimmung apparenter Molekulargewichte wurden analytische Gelfiltrationssäulen mit dem kommerziell erhältlichen LMW-Gelfiltrationskits (2.8) nach Herstellerangaben kalibriert (Abbildung 79).

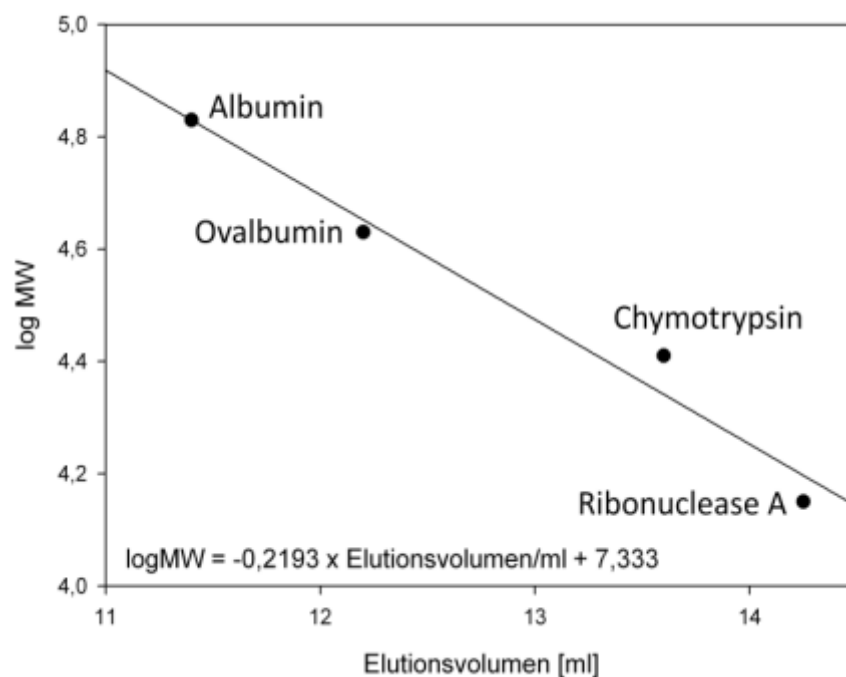


Abbildung 79: Kalibrierung der Superdex 75 HR 10/300 GL Gelfiltrationssäule.

Verschiedene Proteine mit bekannten molaren Massen wurden bei RT mit 50 mM KP, pH 7,5, 300 mM KCl auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Dargestellt ist die Auftragung des Logarithmus der molaren Massen (log MW) gegen das Elutionsvolumen in ml.

6.3 Aktivität von TrpB Enzymen in EPPS Puffer

Es wurde gezeigt, dass Phosphationen an das aktive Zentrum der Tryptophan Synthase α -Untereinheit aus *S. typhimurium* binden und als allosterische Effektoren Einfluss auf das

Verhältnis der PLP-Addukte im aktiven Zentrum der β -Untereinheit haben (Peracchi et al., 1996). Es wurde hier deshalb untersucht, inwiefern die Anwesenheit von Phosphationen die Aktivierbarkeit von sTrpB2i durch sTrpA beeinflusst. Dazu wurden *steady-state* Enzymkinetiken der TrpB-Reaktion (3.5.15.2) und der Gesamtreaktion (3.5.15.3) in Abhängigkeit von der Serinkonzentration unter Verwendung von Kaliumphosphatpuffer oder EPPS Puffer gemessen. Abbildung 80 zeigt beispielhaft Sättigungskurven der TrpB-Reaktion und der Gesamtreaktion des Komplexes aus sTrpB2i und sTrpA in EPPS Puffer.

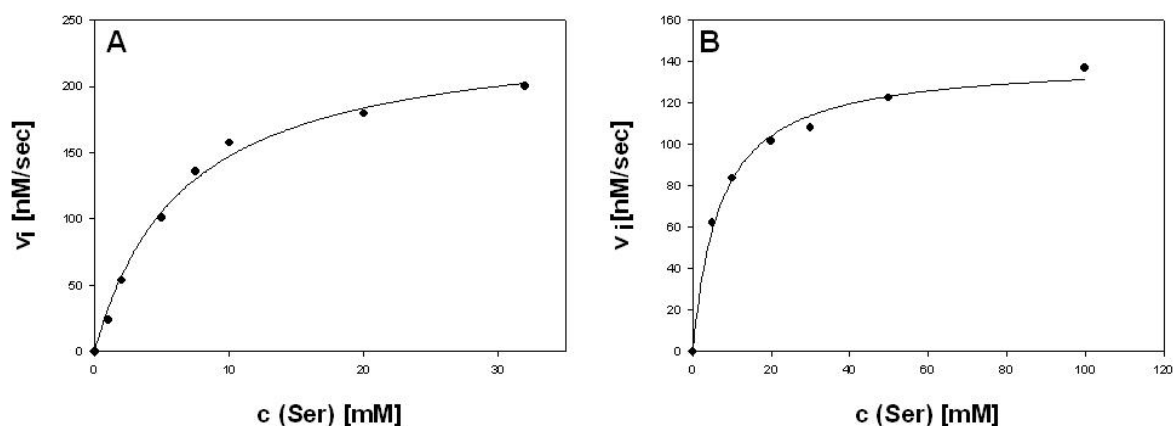


Abbildung 80: Aus *steady-state* Enzymkinetiken abgeleitete Serin-Sättigungskurven der Tryptophan Synthase aus *S. solfataricus* bei 60 °C in EPPS Puffer.

A Sättigungskurve der Tryptophan Synthase Gesamtreaktion, also dem Umsatz von IGP und Serin zu Tryptophan (3.5.15.3). Reaktionsbedingungen: 3 μ M sTrpA, 0,75 μ M sTrpB2i (Untereinheiten), 2 μ M tmGAPDH, 400 μ M IGP ($11 \times K_M^{\text{IGP}}$; Leopoldseder et al., 2006(Leopoldseder et al., 2006)), 100 mM EPPS/KOH pH 7,5, 180 mM KCl, 40 μ M PLP, 6 mM NAD^+ , 20 mM Arsenat, Serinkonzentration: 0-32 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von IGP gestartet. Die Messung erfolgte photometrisch in einem gekoppelten enzymatischen Assay unter Verwendung von $\Delta\epsilon_{340 \text{ nm}}(\text{NADH-NAD}^+)=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die ermittelten Werte für $k_{\text{cat}}=0,33 \text{ s}^{-1}$ und $K_M^{\text{Ser}}=6,6 \text{ mM}$ wurden durch den Angleich einer hyperbolischen Funktion an die gemessenen Werte erhalten (Leopoldseder, 2005). **B** Sättigungskurve der TrpB-Reaktion, also dem Umsatz von Indol und Serin zu Tryptophan (3.5.15.2). Reaktionsbedingungen: 0,75 μ M sTrpA, 3 μ M sTrpB2i (Untereinheiten), 200 μ M Indol ($67 \times K_M^{\text{Indol}}$; Leopoldseder et al., 2006), 100 mM EPPS/KOH pH 7,5, 180 mM KCl, 40 μ M PLP, Serinkonzentration: 0-100 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Indol gestartet. Die Messung erfolgte photometrisch unter Verwendung von $\Delta\epsilon_{290 \text{ nm}}(\text{Indol-Tryptophan})=1,89 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die ermittelten Werte für $k_{\text{cat}}=0,2 \text{ s}^{-1}$ und $K_M^{\text{Ser}}=7 \text{ mM}$ wurden durch den Angleich einer hyperbolischen Funktion an die gemessenen Werte erhalten (Leopoldseder, 2005).

In Tabelle 7 sind die aus den Sättigungskurven der Gesamtreaktion in EPPS-Puffer abgeleiteten Wechselzahlen (k_{cat}), Michaelis-Menten-Konstanten (K_M^{Ser}) und katalytischen Effizienzen ($k_{\text{cat}}/K_M^{\text{Ser}}$) im Vergleich mit der Tryptophan Synthase aus *T. maritima* zusammengestellt.

Tabelle 7: Steady-state enzymkinetische Parameter bei 60 °C der serinabhängigen Gesamtreaktion der Tryptophan Synthase in EPPS Puffer.

Protein	k_{cat} [s^{-1}]	K_M^{Ser} [M]	k_{cat}/K_M^{Ser} [$M^{-1} s^{-1}$]
tmTrpB1+tmTrpA ^a	4,3	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^4$
sTrpB2i+sTrpA ^b	0,1	$6,6 \times 10^{-3}$	15

^a Aus Hettwer & Sterner (2002)

^b Reaktionsbedingungen: Siehe Legende zu Abbildung 80 A.

In Tabelle 8 sind die aus den in beiden Puffern aufgenommenen Sättigungskurven abgeleiteten *steady-state* kinetischen Parameter der TrpB-Reaktion von sTrpB2i mit denen von sTrpB2a, tmTrpB1 und tmTrpB2o verglichen, jeweils in An- und Abwesenheit der entsprechenden TrpA-Proteine.

Tabelle 8: Steady-state enzymkinetische Parameter bei 60 °C der serinabhängigen TrpB-Teilreaktion der Tryptophan Synthase: Vergleich von 50 mM Kaliumphosphat- und 100 mM EPPS- Puffer.

Protein	k_{cat} [s^{-1}]	K_M^{Ser} [[M]	k_{cat}/K_M^{Ser} [$M^{-1} s^{-1}$]
tmTrpB1+tmTrpA in KP ^a	8	$3,7 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^3$
tmTrpB1+tmTrpA in EPPS ^b	2,8	$4,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^3$
sTrpB2i in KP ^c	0,2	$3,5 \times 10^{-2}$	$5,7 \times 10^0$
sTrpB2i in EPPS ^b	0,2	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^1$
sTrpB2i+sTrpA in KP ^c	0,2	$4,6 \times 10^{-2}$	$4,3 \times 10^1$
sTrpB2i+sTrpA in EPPS ^b	0,2	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^1$
tmTrpB2o in KP ^a	0,4	$5,0 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^0$
tmTrpB2o+tmTrpA in EPPS ^d	0,2	$5,9 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^0$
sTrpB2a in KP ^c	0,03	$1,5 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^{-1}$
sTrpB2a+sTrpA in EPPS ^d	0,02	$9,4 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-1}$

^a Aus Hettwer & Sterner (2002)

^b 1 μ M (Untereinheiten) tmTrpB1+2 μ M tmTrpA bei 80 °C bzw. 0,75 μ M (Untereinheiten) sTrpB2i + 3 μ M sTrpA bei 60 °C; Reaktionsbedingungen: Siehe Legende zu Abbildung 80 B.

^c Aus Leopoldseder et al. (2006)

^d 1 μ M (Untereinheiten) tmTrpB2+3 μ M tmTrpA bei 80 °C bzw. 4 μ M (Untereinheiten) sTrpB2a + 6 μ M sTrpA bei 60 °C; Reaktionsbedingungen: Siehe Legende zu Abbildung 80 B.

Es zeigte sich, dass die Verwendung von EPPS Puffer bei der Messung der TrpB-Reaktion von tmTrpB1 und sTrpB2i eine deutliche Absenkung des K_M^{Ser} in Vergleich zu Kaliumphosphatpuffer zur Folge hat (Tabelle 8). So nimmt der Wert für den Komplex aus tmTrpA und tmTrpB1 um den Faktor 10, der Wert für freies sTrpB2i um den Faktor 5 und der Wert für den Komplex aus sTrpA und sTrpB2i um den Faktor 7 ab. Die k_{cat} Werte sind in den beiden Puffern sehr ähnlich, lediglich die *T. maritima* Enzyme zeigen in EPPS Puffer eine Abnahme der Wechselzahl um den Faktor 3. Obwohl ebenso wie in KP auch in EPPS Puffer keine Aktivierung von sTrpB2i durch sTrpA zu beobachten ist, zeichnet sich die

entsprechende TrpB-Reaktion somit durch niedrigere, physiologisch wohl sinnvollere K_M^{Ser} Werte aus. Die ermittelten K_M^{Ser} Werte für tmTrpB1 und sTrpB2i stimmen gut mit den Werten der Gesamtreaktion überein (Tabelle 7), die ebenfalls in EPPS Puffer gemessen wurde; daraus folgt, dass die Anwesenheit von IGP keine weitere Absenkung des K_M^{Ser} bewirkt. Bei der Messung der TrpB-Reaktion von tmTrpB2o und sTrpB2a hat die Verwendung von EPPS Puffer keine Auswirkung auf den K_M^{Ser} im Vergleich zu Kaliumphosphatpuffer. Auch die k_{cat} Werte sind nahezu unbeeinflusst, und der Zusatz der jeweiligen TrpA Enzyme hat keine Auswirkung auf die katalytischen Parameter, was die fehlende funktionale und physikalische Interaktion von TrpB2o und TrpA unterstreicht.

6.4 Synthese von Indolpropanolphosphat

Die in Kapitel 3.4.4 beschriebene Synthese des TrpA-Liganden Indolpropanolphosphat (IPP) wurde in zwei Stufen durchgeführt. Die erste Stufe, die Reduktion von Indolpropansäure zu Indolpropanol mit LiAlH_4 , verlief quantitativ und das Produkt Indolpropanol wies in analytischen *reversed phase* HPLC Läufen keine Verunreinigungen auf. Obwohl die wässrige Phase nach Extraktion mit Ethylether eine tiefgelbe Färbung zeigte, befand sich Indolpropanol vollständig in der Ethyletherphase (Abbildung 81 A). Die Identität von Indolpropanol wurde über ^1H NMR Spektroskopie bestätigt, wobei sich folgende Verschiebungen ergaben: ^1H NMR (CDCl_3 -TMS) ppm (δ): 2,0 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 2,87 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 3,74 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 7,0 (s, 1H, CH ind.), 7,1-7,6 (m, 4H aromatisch), 8,1 (s, 1H, NH, verschwindet bei Deuterierung). Diese Werte stimmen gut mit publizierten Werten für Indolpropanol überein (Mamolo et al., 2008).

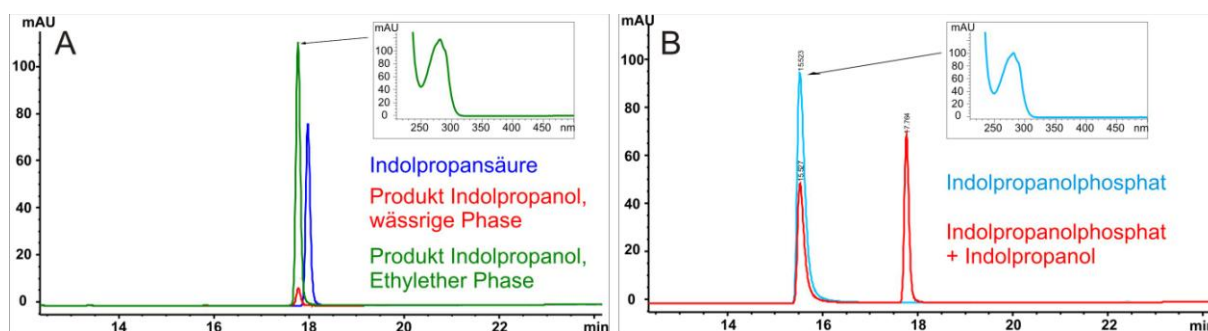


Abbildung 81: Verfolgung der Synthese von Indolpropanolphosphat über *reversed phase* HPLC.

A Erste Synthesestufe. Die Reduktion von Indolpropansäure (blau) zu Indolpropanol erfolgte quantitativ. In der wässrigen Phase der Extraktion wurden nur Spuren des Produkts gefunden (rot), Während sich der Großteil von Indolpropanol in der Ethylether Phase befand (grün). Das Inset zeigt das Absorptionsspektrum. **B** Zweite Synthesestufe. Die Phosphorylierung von Indolpropanol (rot, eine Mischung aus Edukt und Produkt) zu Indolpropanolphosphat (cyan). Das Produkt wurde vorher einer Reinigung über Anionenaustauscherchromatographie unterzogen (3.4.4). Die Elution erfolgte jeweils über eine Phenomenex Luna C18(2) 150x3mm Säule mit 5 μm Partikelgröße und wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Chromatographie erfolgte mit Programm 1 (Kapitel 3.5.11).

Die zweite Stufe, die Phosphorylierung von Indolpropanol zu Indolpropanolphosphat mit POCl_3 /Triethylphosphat führte nach Reinigung über Anionenaustauscherchromatographie (3.4.4) zu einem in analytischen *reversed phase* HPLC Läufen chromatographisch reinen Produkt, welches sich durch die Einführung der Phosphatgruppe deutlich in seiner Hydrophilie von Indolpropanol unterscheidet (Abbildung 81 B). Die Identität von IPP wurde durch Bindungsstudien an tmTrpA und sTrpA bestätigt (Abbildung 39).

6.5 DNA Sequenzen der verwendeten Konstrukte für die Herstellung von Deletionsstämmen

Die gezeigten Sequenzen wurden über *blunt end* Klonierung in den Vektor pJet 1.2 eingefügt. Die farblich codierten Sequenzen entsprechen den in den jeweiligen Legenden angegebenen Genomabschnitten, die Zahlenangaben deren Position im Genom.

Partielle Deletion von tkTrpB2o (Abbildung 62)

cggaaataggaaaggccctcctggagtatctaaccctaaagatagcactgctgacaacgaaggcggagaagttctacgggtggaaggccgatatcctgctcgatgatggcatgagttctgacttgagggagttatgtactccctcctcctaaagcacaggaagggtgagagtcacgaacagacaggaggtcgcttaggggtggaatgagcaggctttcaaaaatcgctgggattatactagccgtttgtgttctaagtccgtttgttacttaaaatattacagaatagaacccgtgccaaaacccccactttggggcctctccgacccccagtcttgagaacttaacgtgggttcagagggaaacgttgagatagcaaacacgaccatgtcattggcctctagagttacggagattcattgaagcagttgaaactcctgggtactcaataaactccggaaactggagcagtagccctgccagtgaggcctttggacaagaggggaaagagcttactacctggcatacaacggcaccagatttctctccatcaggggtgggccaacgatgtcatcaacgcactgaaaggcagtggtctgtggcagaccattggattcgagcccgataaatgccccactccagagacgatacttctaaggcaagcgatgtacgtggcaaacaggccttatggagaataacatctcagtagggcgggaaacctgggtggaccgatgccgattggtacctatcgaagataaactcagggtaacgtaggcgacggcgctgcagctgttgatgctcctgtactcaagcgaagaccaagtaaaatagcgtgaatacattatgaaaaaggaggacaggggctgcactttctcagtggtgatgccgaggattacaggggttaatagcttgaaaggcaggaaagccgcagctaaaagccgtggagacggcactccaaggctccgagttagatgactagagtcctgaggggtgtttgactttcaactccatcaaaccacctccagaatttctcatagagtctcctgctgctcgcgcgggttattactgccgtagatcgagcgcctcgactatcacgtagtcagcaccggcctttgatggcatcactggctttccaccctgggcacccactccgggagtcgaaatccttatccccctctcgagccttgaaacggatgtacgagaccgctccggcctggtcgcaggagctattacgccgaaggggtccagctcgttgcaagttcgatcagctgtcggtagcgggtgaatgaactcttagctccgggatggctcatctcgacaacgatgatcgttttccaagctccataacggcctcaacgctgtcctgcctacgaagccgtgggcaattatgtagtctgcccagcctcgaatacttctcgtcatcagctgttcgtgttgggatatcagcgagtttgaggtcggtattatcggaagccctgtgacctgcttgagctcggtgattatcttcaatccggaaccgatgatgaggggccagtttaccttaattgccagaggaatctgctgtgactccgctatctcaagtcccctccctatcataaacgtcgagcgcagaaatgagcctgctcctccatgtcatcaccttttaacggccctctccaagagccgtcgaaggactcaaacgctcgagattaaattaacccttagtatttaaaaatttcgggtgagcaaaatgcgcgttgaggactagattcttggtctcaatgtaagggtgtacatggcgagggcgagctaccagcagaagccctacaggaagaccataatgcgctgtatggtgctgaaatctatccgagtcgaagcgatagaacagagataggcagaaagtctctggcggaggtccaaacccccggaggtctcgttatagcgataagcgaggccatcgaagacgttttaaggagcgaagggccgctacgcccctgggaagcgtcctcaaccacgtctcatgcaccagaccgtcataggtcttgaggcccaggagcagatgaaggagttcgaagagcccgacgttataatcggtgtgtagcgggaggaagcaacttcgaggttggttatccgttcgcagagacgttctgaaaggagaggctgaatatgagttcatagcgggtgagcctaaggccgctccctcgatgacgaggggagtttacaagtacgactacgggtgattccggaggatacacgccgaaaaatgaatgatcacacccctggccacacatactacgtcccgccgattcacgctggcgctgcgtatcacggactgtccgactctcagcgtcctgataaaccacgggtagttaagccgttgctaccaccagaacgaggtcttcaggcgggtcacctcttcggaagactgaggggtagttccagctccagagagcgccacgcatcaaaggggccatagaccgcgcttgaggcgaagcggggaaggacgtgaagaggtcactactctcaacctcagcgggcacggcttctcgacctaagggtacgaggactatctggatggaagcctgaggactacgagccggagcacttcccggcctggataactactgatttagctcctcctttttctttacagagccattagaaaaa

gaaggggctacttcagatagccgagcttataagccagctcggcggtgagaaccgaacctccagcggcaccctgacgaggtgt
ggcccgttaccagctactgaa

3'-terminaler Bereich von tk1440 (1265332 bis 1265533)

tk1441

pyrF

3'-terminaler Bereich von trpB2o (1267133 bis 1268019)

5'-terminaler Bereich von tk1443 (1268020 bis 1268132)

Partielle Deletion von tkTrpB1 (Abbildung 64)

ccggagatagtcctcgaggcgggggtacctatcctcggggtctgctcggccaccagataatagcgacggcattcggcgggaa
ggtggggagggttaaagcccaggcacgggaaggccagccccgtgaagcacgacgggaaggcggtttgaagggaatcaag
aaccgcgtgaccgctggaaggtaccactccctcgccgttctggaggttcaagggagtttgatgtgagcgcgtttccctcgacga
taacgtggtcatggggataaggcacaggaagctcccgatagagggccttcagttccaccctgaaagcggttgcacgaatggga
gaggaagaaggcttgaggatcatcaaaaactcgtggagatgagcagaaatggtgagttcgtaagatatgcggcgtaaaaa
caatggatgagctcaggcttgcgagaggtacgccgatgaacgggagtggtggtgaactcaaggtcgaagaggaaggtgcc
gctgaagacggccgaggctgattgagatggcagagatcccaatctacctcgttccaccatgaagacctcccagagtgggc
caacgcggtagagaagaccggggccgagtacatacaggtgcactcggacatgcacccaaggccgtcaacaggctgaagg
atgagtacggggtgagcgttatgaaggccttcattggtccaaggagagcgacgacccccgcggaagatgcggaaggctcct
cgagctcatagggcagtagcaggttgacaagatactcctcgacacaggggtggggagcgggaggaggcacgactacagggg
gagcgcgataatagccaaggagtaccgatagtcctggccgaggtttgaccccgagaaacgttggggaagcgataaggtgg
gttaaaccagctggagtcgacgtttcgagcggcggttgagaggaacggcgctcaaggacaggggtttgatagaggccttcattggcg
gtggtgaggaactagtcgcaacgcgcattttgctcaccggaaaattttaataactaagggttaatttaactcgcgagcgtttgagtcct
tctgacggctcttgagagggccgttaaaaagggtgatgcataaggagagagcaggctcattctggcgctcgacgtttatgatag
gagaggcacttgatagcggagtgacagcagattacctctggcaattaaggtaaaactggccccctcatcatcggttccgat
tgaagataatcaccgagctcaagcaggtcacagggttccgataatagccgacctcaaaactcgtgatatccccaacacgaac
agactgatagcgagtaaagtattcgaggctggggcagactacataattgccacggcttcgtaggcaggagacagcgttgaggc
cggttatggagcttgaaaaacgatcatcggtgctgagatgagccatcccgagctaaagagttcattcagcccgtcaccgacaag
ctgatcgaacttgaaacgagctggaacccttcggcgtaatagtcctcgcgaccaggccggagcgggtctcgtacatccgttcaa
ggctcgagaggggggataaggattttactcccggagtggtgcccagggtgggaaagccagtgatgccatcaaaggccggt
gctgactacgtgatagtcggggcgctcgatctacggcagtaataacccgcgcgaggcagcaaggagactctataggaaattct
ggagggtggttgatggagttgaaagtcaaacacccccctcaggactctaggtgaacgcccggcgagctcggcggtttccacggcat
gctcagctacttctccagaacgaggaggggcccagataactcctacccacagcgtttcgcggggctcgactacccgggagttgg
tcccgagcacgcctacctcaaggatagcgggaaggggccgagtagctcacggtgaccgacgaggaggtctgagagccttcac
gagctttccaggacggagggaatacttccagcgtcgaatcgccacgcggtagcctacgcgatgaaaatagcccagagat
ggataaagacgagataatcatatgtaacctctctgggagggggcgacaaggacctggatatagtcaggaggggtcggaatgttt
gaagagggtcgtgattccctatctcacggccggcgacccgagtgctgaaaagacccttgagttttactagcggctgaagagtt
cgccggtctaatagagctcggaatccccttcagcgacccgatggcgacgggaagacgatccaggagtccactaccgcgcc
ctgaggaacggcttcaaacctgatgataccttcaggatcctccgcgagttcaggaggcactccttaccacagtaattctgatgac
ctactacaacccggttttcaggacgggcgttaagaagttcctcgagaggctaaggccagcggggccgacgggatcctcgtggt
tgaccttctgtgagccatgcagggaattcctcgatgcggccaaggaagaggggctaaagacagtatcttctgcagcccaaaa
cactcccgatgaaaggcttagggagatagataaagccttaccggcttcgtctaccttatcctctgacgggaccactggagccc
gcgacagactcccagacggcttcgagttcgtgaggcgccgagaaagatatgcaacaacaagctggcagtcggcttcggt
gtttcgaggagggagcaggtggaggagctttgaaggctggagccgacg

3'-terminaler Bereich von trpG (214429 bis 214819)

trpF (214820 bis 215429)

pyrF

3'-terminaler Bereich von trpB1 (216230 bis 216599)

5'-terminaler Bereich von trpA (216599 bis 217238)

Komplementation durch $\Delta hisD::trpB1$ (Abbildung 66)

aatccctgccgatatccgcgggcagggaaaagggccttgtggagactcttcaacttcagggggaagaggtcgggcgtcgaaaag
ctcgacgcgatagcggagctcctcgccgatgagaggggtttcctggacttcgggaccgtgaggccgtcccctactacacagac
gtcatctttgaggtctatttccgaggtcgggaagccccttggcgccggcgaggagctggtggggaataaaaagccatag
gctttgccctcgacttaggagccctctgaagctctacagggggcgggaaaggaagaggcaggtgctcacgggagagcctggg
gaagtctacaggagggccaggagctcgtgaaaaatgggcattcccgtggaggtgaggccatga**ggttcgttctccgaaagga**
aggctcctaagcccagcatagagttcctgaggaaagctggagttgagctggagctcccgaacgggagggagctgttcggcc
gatggtaggggttctcctcgaggggcttcgacgttcccgttacgtcgaaacacgggggtgaggtgggagatgctggcagcgacgt
ggttttgagaggggggagcgacgttttcattcccctggaactgccctcgaaagtgcaggataagcgtggccgttcccggggag
aggaaaaggtatcctgaggacatggactgcttcaggatagccacgaaatacccacggatagcaagctctatttcgactcgattg
gcgttgacgttgaggttatgaagctccacgggagcgttgagctcctcgtaggacggggatagccgatgccatagttgacatcgtc
gagaccggccagacgctgagggagaacggcctcgtcgaggttccaaggtatggacgttccgcgctccttctcgtcaacagg
atagcgcagaaggttctgtcgtatgataaacgagcgttgatgaagcttaggggggttttgatgaaggggcttga**cgc**
cgcattttgctacccgaaaattttaataactaagggtaatttaactcagagcgtttgagtccttctgacggctcttgagagggcc
gttaaaaaggtgatgcatatggtatgatgttcttcggaaggtttgggggacagttcgtccccgagacgcttatagaaccttgaaga
agcttgaaaagggcttcaaaaaagttcaaggacgacctgagttcaacgaaacctcgagtactacctgcggaactgggaggga
aggccgacgccccctactacgcggagaggttagcaaaaagctgggagggggcgaagatatacctcaagagggaggacctc
ctccacggcgggggccacaagacgaacaacggcatagggcaggccctcctcgccaagttcatgggaaggagagggctcata
gccgagaccggggcgggccagcacggcgtcgccacggccatggcgggggcgctcctcggtatgaaggtagacgtttacatg
ggcgccgaagacgtcgagaggcagaagatgaacgtcttcgcgatggggctgctcggcgaggggttattcccgtcgaaagcg
gctcaagaacctgaaggtatccataaacgaggccctccgcgactgggttgcaccttcgagtactcccactacctaataaggctc
gggtgtcggggccctaccatacccggtcatcgtgagggacttcagtcggtaataggcaggaggccaggagcagatactcg
aagccgaggggacgctaccggtatgcggtagtggcatgtgtcggggcgaggagcaacgcaatgggcatcttctacccctcgtg
aacgataggggtcaggctcataggcgtcgaagccgggggaaagggcctcgaaacgggcctccacgggcctcgtgaacgcc
ggcgagctcggcgttttcacggcatgctcagctacttctccagaacgaggaggccagataactcctaccacagcgtttcgg
cggggctcgactaccgggagttggtcccagcacgcctacctaaggatagcggaagggccgagtagctcacggtgaccga
cgaggaggtctgagagccttccacgagcgttccaggacggaggggaatacttccagcgctcgaatcgggccacgcggtagcct
acgcgatgaaaatagccccagagatggataaagacgagataatcatagtcacactctctgggaggggagacaaggacctgg
atatagtcaggaggggtcgggaaatgtttga**agagcagcccttgccgcgaagcgctggcggaatggttgggactatctgattgaa**
gaatctatccggagggccctgccatgaggaggactacgaaggagaccgatatagaggttgagcttgacgtcgagggaaaccgt
agagacgggcgatccagtcctgaatcacctcctgatggccctcttccactacatgggaaggaatgccgggttaaagcgaacta
cgaacctcaggcaccacctctgggaggacgtggggataaccctggggctggagctgagggagaagctcccagggaagtgcg
ccgcttcgggagcgctgtaatgccgatggacgacgcgctcattctggttgccctgacatctctgggagggccctacctaacctga
gctcttcccgtggaggaagaggaggaggttcagcgtaacactcgtcagggagttcctctgggggctggcgcgctcgtcagggc
aacgatacacgtcaaacagcttgggggagtaaaccgcgcaccacataatagaggccgcttcaaagggctaggaatagccctc
gccagggtatagcggagagcgaaaaggctggagagcaccaaggggggtcctggaatga**tagccgtagtgcacctcgggatag**
ggaacctcgccaacgtgaggaaggccctcggaggggtgatcacgagcgacccctacgcgatagagggggccgagaagata
gtcctcccggggtcggaacttcggggcggtgatgaaaagctggaaccgctcaggggagttataatcgatgcgataaacga
cggaaagcccctgctgggtatctgctcggcctccagcttctctcgaggggagcgaggagagccccgaaagcctggtctggg
ggtcttcaggggaaatgctgctgcgttccaggcggttaggggtccccacatcggttgaaccaggtgtggcagaggaaggagt
gcccgtcttcgagggcataaaggacggtgcttacttctactcgtccactcctactatgctctcccagaggaggacgtaacggtg
ggagtacggactacgagtcgaagggggccaaggtgttctcacctcgccgtctgcagggacaacggttacggtccagttc
caccccgagaagagcgggaggaacgggctgaggcttttgagaacttcaggaggctgtga

3'-terminaler Bereich von *hisZ* (204082 bis 204479)

hisG

Promoter von *pyrF*

trpB1

hisB

5'-terminaler Bereich von *hisH* (206814 bis 207401)

6.6 Massenspektren der untersuchten Metabolite aus *T. kodakaraensis*

Die Massen der Metabolite aus Abbildung 74 wurden durch Josef Kiermaier in der zentralen Massenanalytik der NWF IV der Universität Regensburg über LC ESI-MS ermittelt. Dabei wurden jeweils für den KU216 Wildtyp Extrakt (Abbildung 82) und den KU216 $\Delta trpB2o$ Extrakt (Abbildung 83) HPLC Trennungen mit gleichzeitiger massenspektrometrischer Detektion im positiven und im negativen Ionisationsmodus durchgeführt. Dabei konnten nur für einige Metabolite (3, 4a, 5 und 6) Spektren in beiden Modi gewonnen werden, bei den restlichen ist der Modus gezeigt, bei dem das Molekül ionisierbar war.

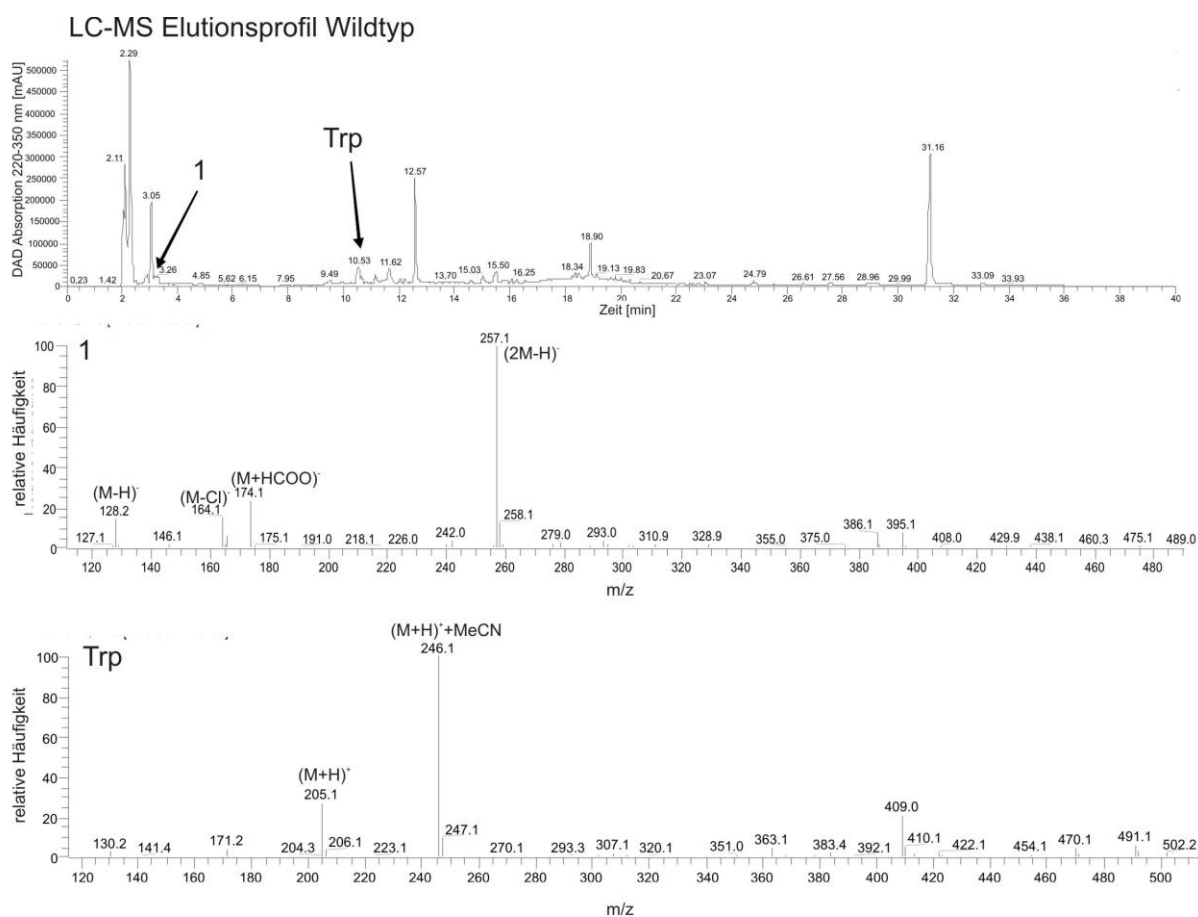
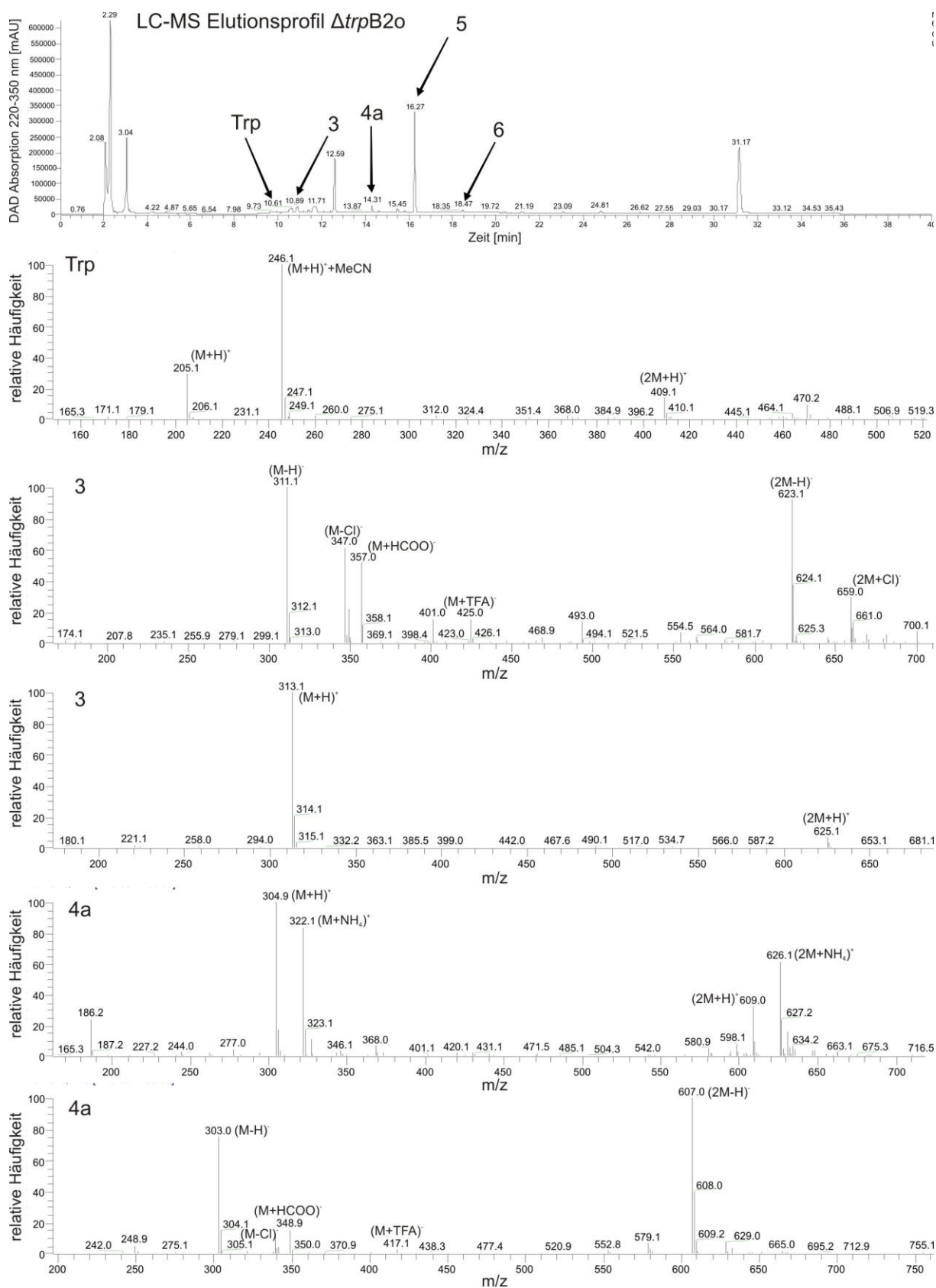


Abbildung 82: LC ESI-MS des methanolischen Extrakts von *T. kodakaraensis* KU216 Wildtyp.

Die massenspektrometrisch untersuchten Metabolite sind im Elutionsprofil markiert und sind wie in Abbildung 74 bezeichnet.



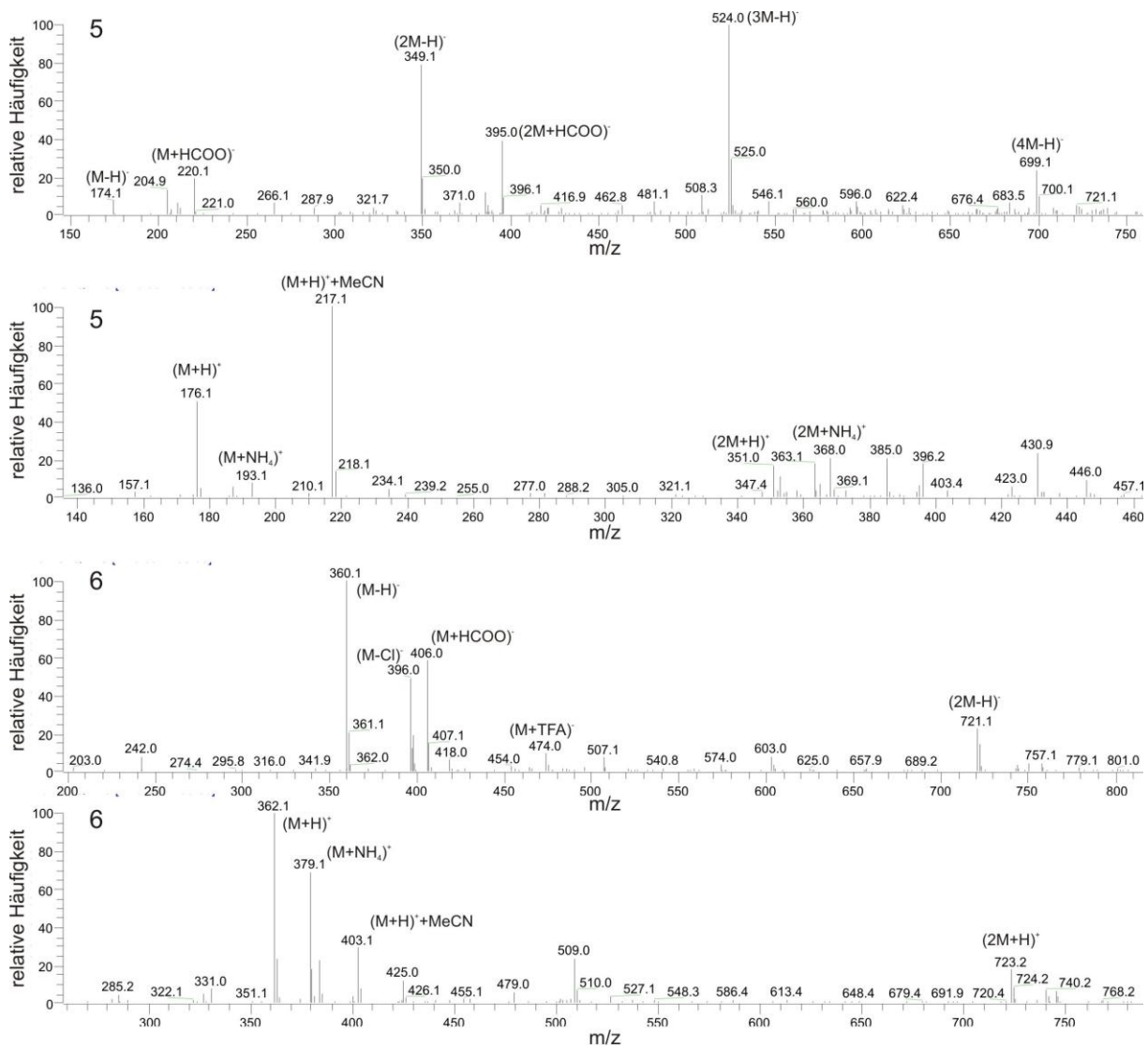
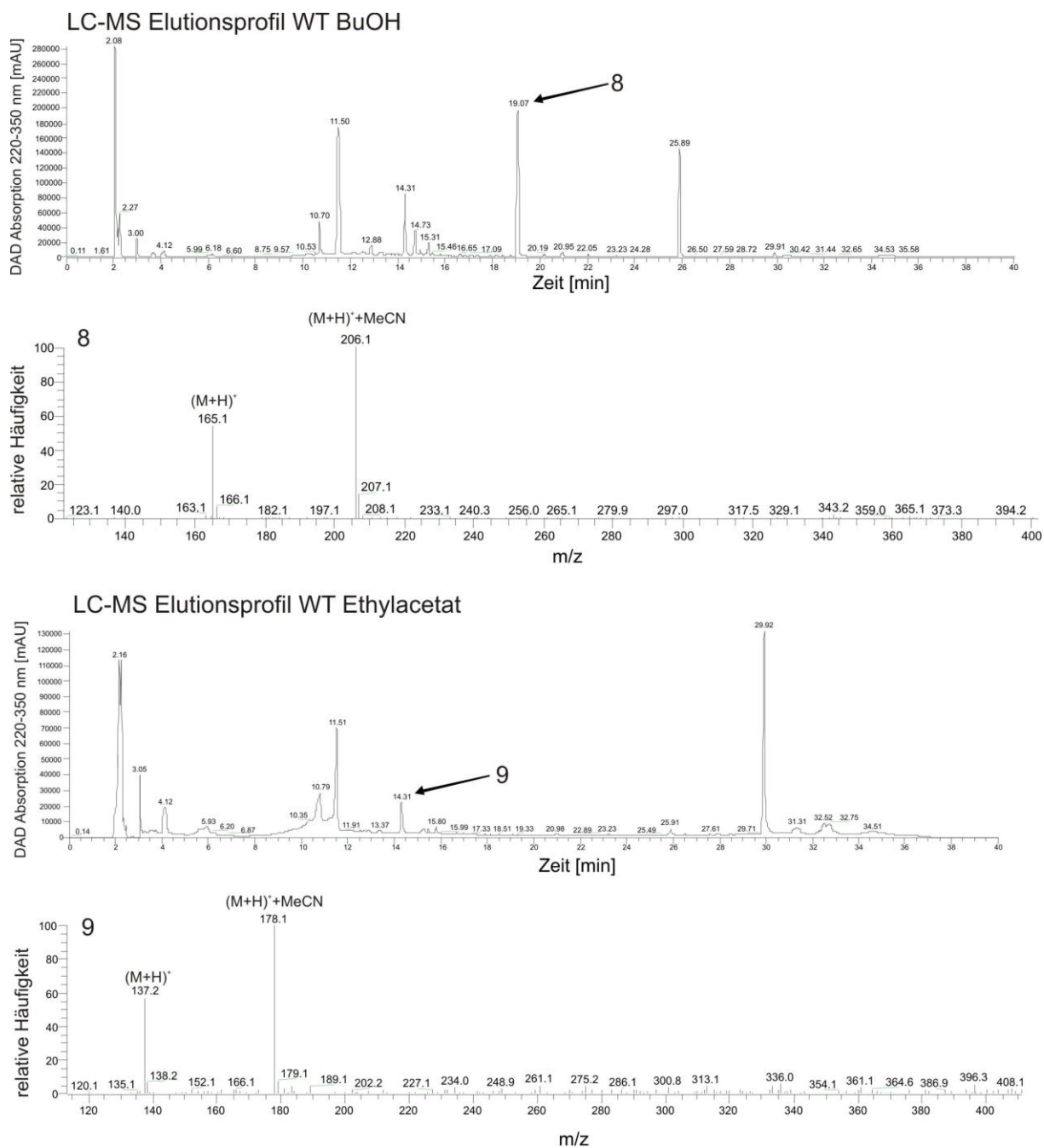


Abbildung 83: LC ESI-MS des methanolischen Extrakts von *T. kodakaraensis* KU216 $\Delta trpB2o$.
 Die massenspektrometrisch untersuchten Metabolite sind im Elutionsprofil markiert und wie in Abbildung 74 bezeichnet.

Die Massen der Metabolite aus Abbildung 77 wurden ebenfalls durch Josef Kiermaier in der zentralen Massenanalytik der NWF IV der Universität Regensburg über LC ESI-MS ermittelt. Dabei wurde für jeden der drei Extrakte (WT BuOH, WT Ethylacetat und WT CHCl_3) HPLC Trennungen mit gleichzeitiger massenspektrometrischer Detektion im positiven Ionisationsmodus durchgeführt (Abbildung 84).



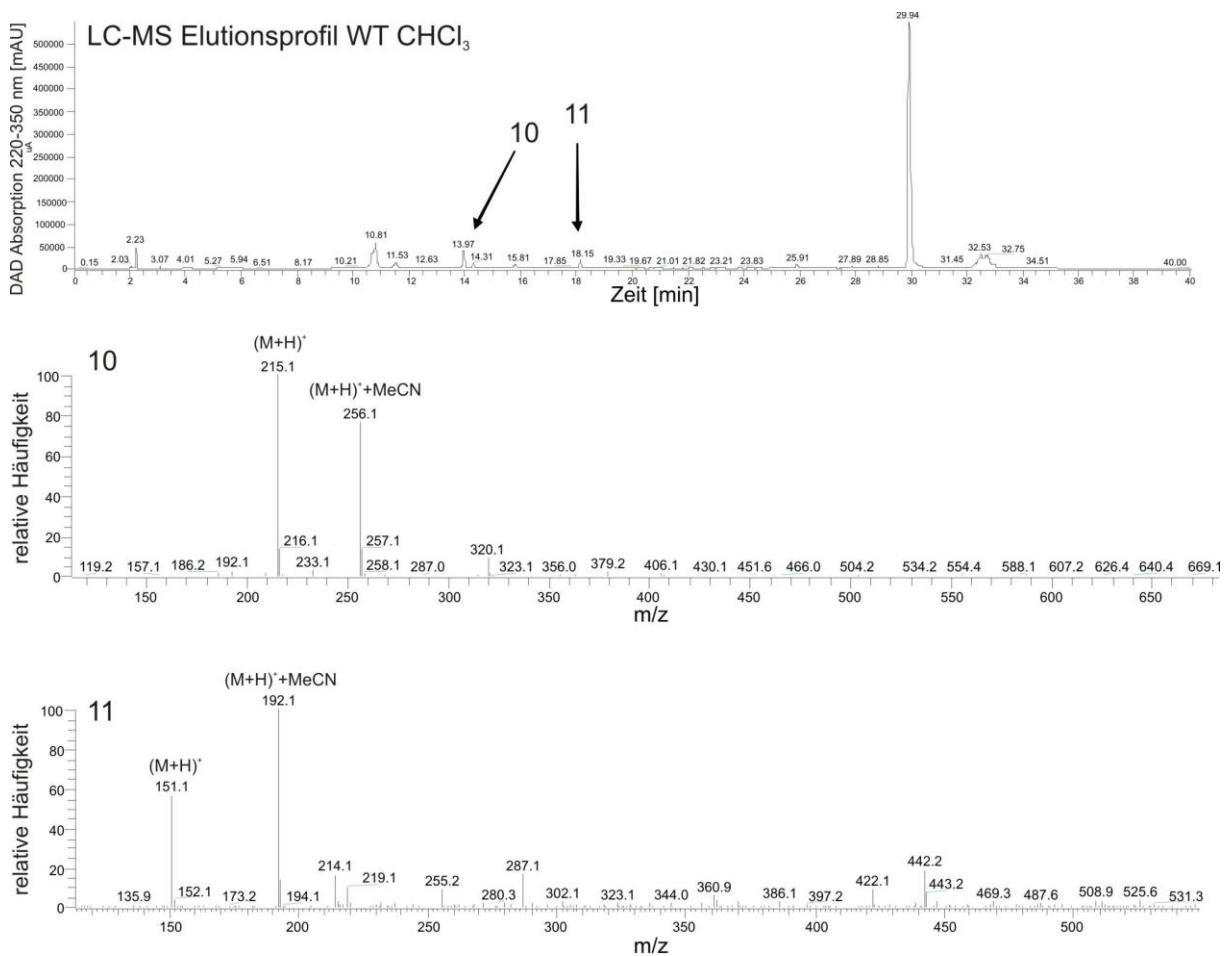


Abbildung 84: LC ESI-MS der organischen Extrakte aus Fermentationsüberständen von *T. kodakaraensis* KU216 Wildtyp.

Die massenspektrometrisch untersuchten Metabolite sind im Elutionsprofil markiert und wie in Abbildung 77 bezeichnet.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner herzlich für das in mich gesetzte Vertrauen, die beiden Projekte sehr selbständig bearbeiten zu können. Ich danke für die stete Bereitschaft zur Diskussion, die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme an interessanten Tagungen und Seminaren.

Herrn Prof. Dr. Michael Thomm danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die großzügige Nutzung seiner Laboreinrichtungen, insbesondere des Biotechnikums.

Ein großes Dankeschön gilt den Kooperationspartnern, die zu verschiedenen Experimenten einen großen Beitrag geleistet haben. Allen voran möchte Ingrid Waege und PD Dr. Winfried Hausner für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Herstellung der Deletionsstämme in *T. kodakaraensis* danken. Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann danke ich dafür, dass er immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und sehr gute experimentelle Strategien für die Reinigung und Charakterisierung der Metabolite aus *T. kodakaraensis* erarbeitet hat. Außerdem danke ich ihm für die Übernahme der Rolle des Drittprüfers meiner Prüfung.

Dr. Klaus Richter danke ich herzlich für die Durchführung der analytische Ultrazentrifugationsläufe, den Rat und die guten Ideen für neue Experimente. Bei Dr. Sonja Albers möchte ich mich herzlich für die Hilfe bei der Erstellung von Expressionsstämmen in *S. solfataricus*, der Nutzung ihres Labors während des sehr interessanten Kurses in Groningen und ihre Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Sonja Fuchs für ihre Hilfe und ihren unermüdlichen Einsatz bei der Reinigung von sTrpB2i, einem Protein, das sich gerne etwas „einspreizt“, bedanken. Bei Christiane Endres, Barbara Kellerer, Hermine Reisner und Jeannette Ueckert möchte ich mich hiermit herzlich für die vielen kleinen und großen Hilfestellungen im Labor bedanken. Josef Kiermaier und Eduard Hochmuth gaben mir sehr hilfreiche Ratschläge zum Thema Massenspektrometrie und ich möchte mich für die Erstellung der Massenspektren bedanken. Thomas Hader und Konrad Eichinger gewährten mir Einblicke in die Welt der Fermentation und ich danke ihnen herzlich für die Kultivierung von *T. kodakaraensis*. Bei meinen ehemaligen Praktikanten Karin Weigelt, Christoph Ratzke, Philipp Merkl und Florian Busch möchte ich mich für ihren großen Einsatz und die guten experimentellen Ergebnisse bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kollegen Dr. Patrick Babinger, Harald Guldan, Felix List und Daniel Schneider bedanken. Neben sehr hilfreichen fachlichen Diskussionen haben wir natürlich auch eine „saubane Gaudi“ gehabt. Auch Bernd Reisinger, Josef Sperl, Monika Meier und Dr. Jörg Claren konnten zu dieser einen „signifikanten Beitrag“ leisten. Bei Sepp möchte ich mich besonders für die Hilfe bei der Synthese von IPP bedanken. Dr. André Fischer, PD Dr. Rainer Merkl, Dr. Sandra Schlee und Dr. Helmut „DU“ Durchschlag ließen mich oft über den Tellerrand blicken und ich danke ihnen für die interessanten Impulse zu meiner Arbeit. Für eine hilfsbereite und stets angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei Anke Behr, Dietmar Birzer, Dr. Marco Bocola, Nadine Borst, Kathleen Burghardt, Linn Carstensen, Susanne Dietrich, Claudia Pauer, David Peterhoff, Thomas Schwab, Tobias Seitz, Klaus Tiefenbach, Hermann Zellner und allen Ehemaligen, die hier nicht genannt sind, bedanken.

Meinen Eltern und meiner Schwester Nicole danke ich für ihre Unterstützung während des Studiums, der Promotion und in allen Lebenslagen und schließlich dafür, dass sie mir das alles erst ermöglicht haben.

Ganz besonders danke ich Karo für ihre liebevollen Aufmunterungen, ihre Geduld und Unterstützung während der letzten vier Jahre.

8 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Sterner betreut worden.

Regensburg, den 12.01.2010

Alexander Ehrmann

Posterbeiträge

Leopoldseder S., Bolz C., Ehrmann A., Hettwer S. & Sterner R., 2006, Tryptophan Synthases from hyperthermophiles: Novel Architectures and functions. *Faltertage, Halle, Leipzig*.

Ehrmann A., Leopoldseder S., Hettwer S. & Sterner R., 2008, Evolution of multi-enzyme complexes: transient complexes in ancient tryptophan synthases. *2nd International Conference on Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions, Dubrovnik*.

Ehrmann A., Waage I., Kiermaier J., Hausner W., Heilmann J. & Sterner R., 2009, In search for a function of a homologue of tryptophan synthase β -subunit. *First International Symposium on Structural Systems Biology, Hamburg*.